



FACULTAD DE  
MEDICINA UNIVERSIDAD  
DE CANTABRIA

## **GRADO EN MEDICINA**

### **TRABAJO FIN DE GRADO**

**Detección prenatal de anomalías genéticas por análisis  
en sangre materna**

Non-invasive fetal diagnosis testing from maternal blood

**Autora:** D. <sup>a</sup> Eva Vega Cuesta

**Directora:** D. <sup>a</sup> Elena Cabezón Navarro

**Santander, junio 2020**

## **RESUMEN**

**Objetivo:** conocer las intervenciones llevadas a cabo actualmente sobre la detección prenatal de anomalías genéticas en sangre materna en el Sistema Público de Salud en España, así como sus limitaciones y perspectivas futuras.

**Metodología:** revisión narrativa mediante una búsqueda bibliográfica en las bases de datos Pubmed, Cuiden, Crochane y Scielo de estudios publicados entre 2012 y 2020. Se establecieron criterios de inclusión, exclusión y limitadores.

**Resultados:** en este análisis han sido incluidos diferentes artículos y ensayos clínicos en los que se obtuvieron temas comunes que inciden en las intervenciones de estudio: 1) diagnóstico prenatal no invasivo en sangre materna; 2) Secuenciación de segunda generación y otras técnicas moleculares; 3) protocolos de análisis de sangre materna y de edad materna de las gestantes; 4) Fecundación y cribado de gestantes de alto riesgo.

**Conclusiones:** el test de diagnóstico prenatal no invasivo en sangre materna es actualmente un método válido para la búsqueda de numerosas anomalías cromosómicas. Aun así, sigue siendo un método de cribado, y para la confirmación de las pruebas que resulten positivas se requieren métodos invasivos, como la amniocentesis. El incremento de la edad materna es una realidad actual que implica un aumento de riesgo relacionado con la presentación de anomalías cromosómicas en el feto. Actualmente este método está ya implantado en muchos de los servicios públicos de salud en aquellas gestantes en las que se detecte alto riesgo mediante las pruebas que forman parte del triple screening. También se puede acceder a este test a través de laboratorios privados, aunque su elevado coste continúa siendo un problema. Los laboratorios tienen en común la realización de las pruebas para la detección de las trisomías 21, 13 y 18, así como la determinación del sexo fetal y del factor Rh, pudiendo después contar con pruebas más ampliadas para la determinación de otras anomalías. El creciente avance de las técnicas moleculares, como es el desarrollo de la secuenciación de segunda generación, nos permite hoy en día el diagnóstico de numerosos síndromes asociados a aneuploidías, además de deleciones, duplicaciones y mutaciones más complejas asociadas a una herencia monogénica de origen paterno. A pesar del gran avance en la capacidad diagnóstica de estas pruebas, aún tiene importantes limitaciones, como el diagnóstico de inversiones, traslocaciones y otras reorganizaciones cromosómicas, ante las cuales sería necesario el uso de pruebas invasivas.

**Palabras clave:** *Diagnóstico prenatal no invasivo, ADN fetal en sangre materna, Secuenciación masiva, Edad materna avanzada.*

## **ABSTRACT**

**Objective:** to learn about the assistance offered by the Spanish Public Health System on prenatal diagnosis of genetic diseases; in particular on non-invasive fetal DNA testing from maternal blood

**Methodology:** a review was conducted using PubMed, Cuiden, Cochrane and Scielo databases of studies published between 2012 and 2020. Inclusive exclusive criteria and limiters were established.

**Results:** In this analysis, different articles and clinical trials have been included in which common themes that affect study interventions were obtained: 1) non-invasive fetal diagnosis testing from maternal blood; 2) Next generation sequencing and other molecular techniques; 3) protocols for analysis of maternal blood and maternal age of pregnant women; 4) Fertilization and screening of high-risk pregnant women.

**Conclusions:** The non-invasive fetal diagnosis testing from maternal blood is currently a valid diagnostic method in the search for chromosomal abnormalities. Even so, it continues to be a screening method, and invasive methods, such as amniocentesis, are required to confirm positive tests. The increase in the maternal age is a real problem since it implies a high risk for chromosomal abnormalities in the fetus. Currently, testing from maternal blood is already implanted in many of the public health services and it is offered to pregnant women with a high risk detected by means of triple screening tests. Testing from maternal blood is also available at some private laboratories, although with a high cost. Laboratories offering this test are able to detect 21, 13 and 18 trisomies, as well as determine the fetal sex and Rh factor, together with other abnormalities. The increasing advance in molecular techniques, such as the development of next generation sequencing, allows us today the diagnosis of aneuploidies, deletions, duplications, as well as more complex mutations with a paternal monogenic inheritance. Despite the significant progress in the diagnostic capability of these tests, they still have important limitations, such as the diagnosis of inversions and chromosomal translocations, which require the use of invasive tests.

**Keyword:** *Non-invasive prenatal diagnosis, Fetal DNA in maternal blood, Massive sequencing, Advanced maternal age.*

## **ÍNDICE**

<b>1. INTRODUCCION .....</b>	<b>1</b>
1.1. Alteraciones numéricas y estructurales de cromosomas humanos .....	2
<b>2. OBJETIVO .....</b>	<b>10</b>
<b>3. METODOLOGIA .....</b>	<b>11</b>
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>12</b>
4.1. Importancia de la edad materna en las enfermedades genéticas .....	12
4.2. Técnica combinada de cribado .....	13
4.3. Análisis de ADNfe en sangre materna .....	14
4.4. Tipo de muestra .....	15
4.5. Tecnologías aplicadas al diagnóstico prenatal en sangre materna .....	17
4.5.1. Purificación y enriquecimiento del ADNfe .....	17
4.5.2. Diagnóstico prenatal no invasivo basado en ADNfe libre basado en secuenciación de nueva generación (NGS) .....	18
4.6. Aplicación de las técnicas de secuenciación NGS en la determinación de aneuploidías a partir de ADNfe en sangre materna .....	23
4.7. ¿En qué contexto se aplica en la sanidad pública? .....	25
4.8. Otras aplicaciones .....	28
4.8.1. Determinación del sexo e implicaciones en el asesoramiento sobre enfermedades ligadas al cromosoma X .....	28
4.8.2. Determinación del Rh+ en embarazos de riesgo (mujeres Rh -) .....	29
4.8.3. Micro -deleciones y -duplicaciones .....	30
4.8.4. Enfermedades monogénicas heredadas por vía paterna .....	30
4.9. Problemas éticos asociados .....	32
4.10. Ventajas y limitaciones de esta técnica .....	34
<b>5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS .....</b>	<b>37</b>
<b>6. BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>38</b>
<b>7. AGRADECIMIENTOS .....</b>	<b>42</b>

## **1. INTRODUCCION**

Hasta hace relativamente poco tiempo, el diagnóstico de una anomalía cromosómica implicaba la obtención de células fetales mediante pruebas invasivas como la amniocentesis. Esta técnica se usa para la determinación del cariotipo, pero conlleva un importante riesgo de pérdida fetal postpunción (1). Además, el progresivo incremento de la edad de las mujeres gestantes lleva asociado un mayor riesgo de aneuploidías, por lo que muchas de estas mujeres se ven en la tesitura de decidir si quieren someterse a esta prueba invasiva, asumiendo así sus riesgos (1).

En 1997 se descubrió la presencia de ADN fetal (ADNfe) libre de células en plasma materno, lo cual llevó a abrir un nuevo campo de investigación sobre el posible uso de este ADN para realizar diagnósticos prenatales, consiguiendo así evitar técnicas invasivas que conllevan riesgo para la madre y para el feto. La primera utilidad que se le dio a este descubrimiento fue el diagnóstico del sexo fetal, basado en la amplificación del cromosoma Y, y posteriormente la determinación del factor Rh fetal (2,3). Actualmente también es posible emplearla en la determinación de algunas enfermedades asociadas al embarazo (como la preeclampsia), aneuploidías y trastornos monogénicos hereditarios paternos (2). Recientemente, se han logrado avances significativos que ampliarían las aplicaciones potenciales a la secuenciación del genoma completo fetal y a la detección de mutaciones hereditarias de la madre (2).

En la actualidad conocemos que existen fragmentos de ADNfe extracelular en sangre materna que podemos analizar para determinar el número de copias de determinados cromosomas fetales: en concreto los cromosomas 21, 18, 13, X e Y, ya que son cromosomas que llevan aneuploidías conocidas asociadas a diferentes síndromes (1). Según diferentes estudios es posible aislar ADNfe en sangre materna a partir de la 5ª semana de embarazo, proviniendo dicho ADNfe de células apoptóticas placentarias (2,3).

Este estudio ya es una realidad en nuestro entorno y actualmente cuenta con una alta especificidad y sensibilidad para establecer el riesgo de las principales trisomías fetales. Acorde a los datos publicados hasta la fecha, como método de cribado, el estudio del ADNfe tendría una tasa superior de detección y una tasa de falsos positivos inferior al cribado combinado del primer trimestre. Sin embargo, el elevado coste del procedimiento es uno de los aspectos más limitantes y controvertidos en la actualidad, así como la determinación de las gestantes que podrían beneficiarse de esta técnica de manera costo-efectiva, ya que la mayoría de los estudios publicados se han realizado en población de alto riesgo de trisomía 21,18 y 13 y, debido a ello, es en esta población en la que estaría indicado el estudio (1). Por otro lado, debido a que esta técnica permite adelantar el diagnóstico de una posible aneuploidía, es interesante identificar bien a la población de riesgo para poder aplicar este procedimiento y así poder evitar posibles pruebas invasivas innecesarias (1,2). Por tanto, estamos ante un método de cribado no invasivo avanzado de aneuploidía del que se pueden beneficiar gestantes de alto riesgo, que requiere confirmación mediante una prueba invasiva solo en caso de resultado positivo (o alta sospecha a pesar de un resultado negativo) y que permite evitar realizar

pruebas invasivas a gestantes con un resultado negativo, evitando así efectos secundarios como la pérdida fetal (1). Así, por ejemplo, según la tabla de datos mostrada en la Figura 1, en el último año de seguimiento de la prueba de cribado de mujeres gestantes en Cantabria, 153 mujeres entre un total de 3.300 pudieron conocer mediante esta prueba que presentaban un riesgo elevado de anomalías genéticas en el feto. Observamos que según aumenta la edad de las gestantes, aumenta también la probabilidad de presentar un riesgo alto en la gestación.

Edad de las gestantes	Total cribados con TC completado N= 3.330	Cribados TC Riesgo Alto N= 153	% TC Riesgo Alto según edad de la gestante
< 25 años	200	1	0,65
25-29 años	492	8	5,23
30-34 años	1.145	18	11,76
35-39 años	1.141	75	49,02
40-44 años	328	47	30,72
≥ 45 años	24	4	2,61

TC: Test combinado

**Figura 1.** Edad de las gestantes y test combinado de cribado. Figura tomada de Movellán y cols. (2019) (4).

### 1.1. Alteraciones numéricas y estructurales de cromosomas humanos

Entre las principales anomalías genéticas que pueden ser detectadas por análisis de ADNfe en sangre materna están las anomalías cromosómicas numéricas y estructurales. El diagnóstico prenatal de anomalías genéticas es muy importante de cara al nacimiento del nuevo individuo, tanto para su vida futura como para la de sus padres. Una anomalía cromosómica es una alteración en el número de cromosomas o en su estructura (4) (5).

Las anomalías numéricas observadas son de dos tipos: poliploidías y aneuploidías.

#### POLIPLOIDÍAS

Las poliploidías son variaciones en el número total del set de cromosomas. Esta irregularidad consiste en la existencia de más de dos juegos cromosómicos, creando individuos u organismos poliploides. En los humanos las poliploidías son consideradas letales. Las más frecuentes son las triploidías y tetraploidías completas (6). Las triploidías y tetraploidías en humanos no son viables a largo plazo, reportando la muerte de la mayoría de los casos incluso antes del nacimiento. La triploidía suele producirse por dispermia (fecundación del mismo óvulo por dos espermatozoides) o, en menor frecuencia, por endoreduplicación en el ovocito o el espermatocito primarios antes de entrar en meiosis, de forma que el óvulo o el espermatozoide resultante no será haploide, sino diploide (2n). Al juntarse con el gameto del sexo contrario producirá un embrión triploide. En relación con la tetraploidía, ésta se debe de nuevo a un proceso de endoreduplicación en el cigoto recién formado, de forma que el ADN se replica, pero la célula no se divide físicamente, resultando en un organismo tetraploide (4n).

## ANEUPLOIDÍAS

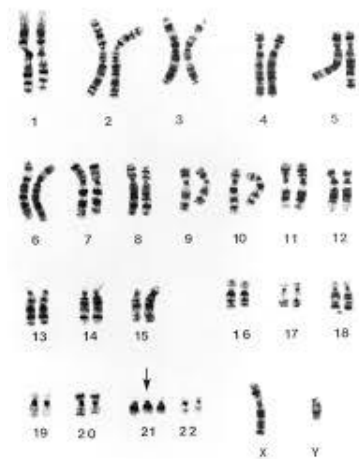
Las aneuploidías son anomalías numéricas que implican tener un número anómalo de alguno de los cromosomas. Dentro de las aneuploidías nos encontramos con autosomopatías (aneuploidías en los cromosomas autosómicos) y gonosomopatías (aneuploidías en los cromosomas sexuales) (7).

### Autosomopatías:

Consisten en alteraciones numéricas en los autosomas, es decir en los cromosomas no sexuales o autosómicos, del 1 al 22. En autosomas no se ha detectado nunca ninguna monosomía (1 copia de un cromosoma en lugar de dos) en nacidos vivos, debido a que no son viables. Dan lugar a abortos espontáneos, por lo que no son de interés para el diagnóstico prenatal. Normalmente estos abortos no se investigan más a no ser que se produzcan abortos recurrentes, en cuyo caso es necesario buscar una causa. Sí están descritas y podemos detectar trisomías (3 copias de un cromosoma en lugar de 2). La mayoría de las trisomías producen embriones no viables, pero hay ejemplos de trisomías viables. Estas trisomías viables ocurren en los cromosomas que tienen menor cantidad de genes, ya que su dosis génica es menor y por eso son viables (7,8).

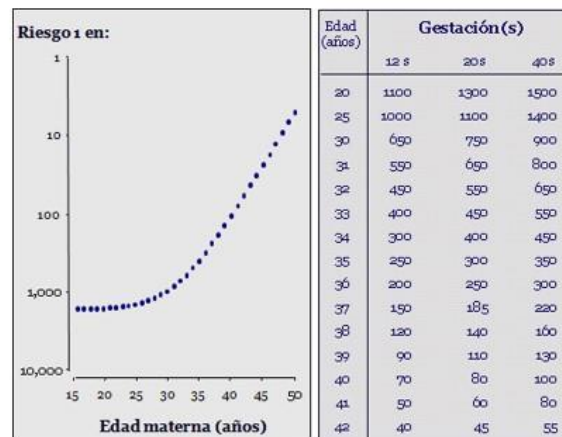
Las trisomías más frecuentes que llegan a término son:

- Trisomía 21 (figura 2) → Síndrome de Down: Tiene una frecuencia muy alta, por eso es la mayor preocupación en el diagnóstico prenatal. Existe retraso mental variable. Su fisionomía es característica y cuenta con la presencia de anomalías internas. La esperanza de vida media es reducida y está alrededor de los 60 años (7).



**Figura 2.** Cariotipo del Síndrome de Down (trisomía 21). Figura tomada de Powell-Hamilton y cols. (2020) (9).

Sucede en 1/800 embarazos. Esta prevalencia no es homogénea, cambia con la edad de la madre (Figura 3). Aunque de media es 1 de cada 800 embarazos, la diferencia según la edad es muy marcada. Así por ejemplo, la incidencia en mujeres de 25 años es de 1/1400, mientras que aumenta a 1/100 a los 40 años (Figura 3) (5,7).

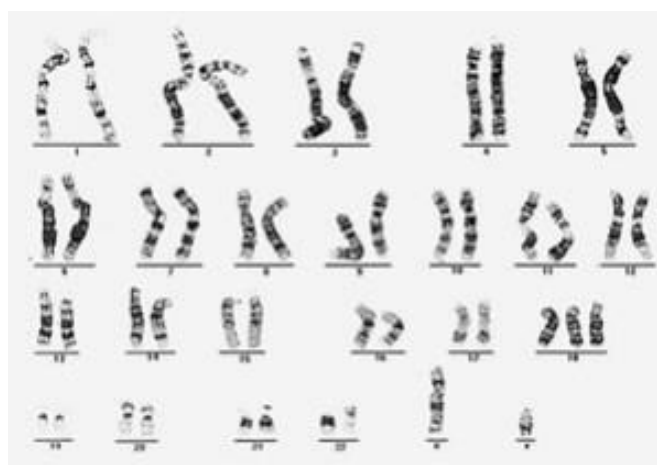


**Figura 3.** Crecimiento exponencial del riesgo de trisomía 21 en función de la edad materna. Figura tomada de Fundación iMaterna (2020) (10).

- Trisomía 18 (figuras 4 y 5) → Síndrome de Edward: en este síndrome existe retraso mental severo, malformaciones en el corazón y puños característicos (Figura 4). Tienen una esperanza de vida muy baja; los bebés que llegan a término viven sólo unos pocos meses. La prevalencia es de 1/7.500, menor que en el síndrome de Down, pero aun así sigue siendo relativamente alta (7).



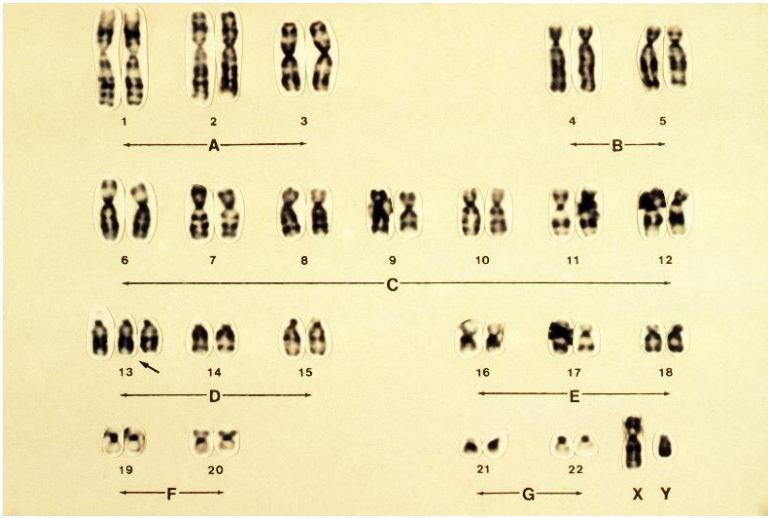
**Figura 4.** Pies y puños de la Trisomía 18. Figura tomada de Powell-Hamilton (2020)(11).



**Figura 5.** Cariotipo de un Síndrome de Edwards (Trisomía 18). Figura tomada de Infogen (2013) (12).

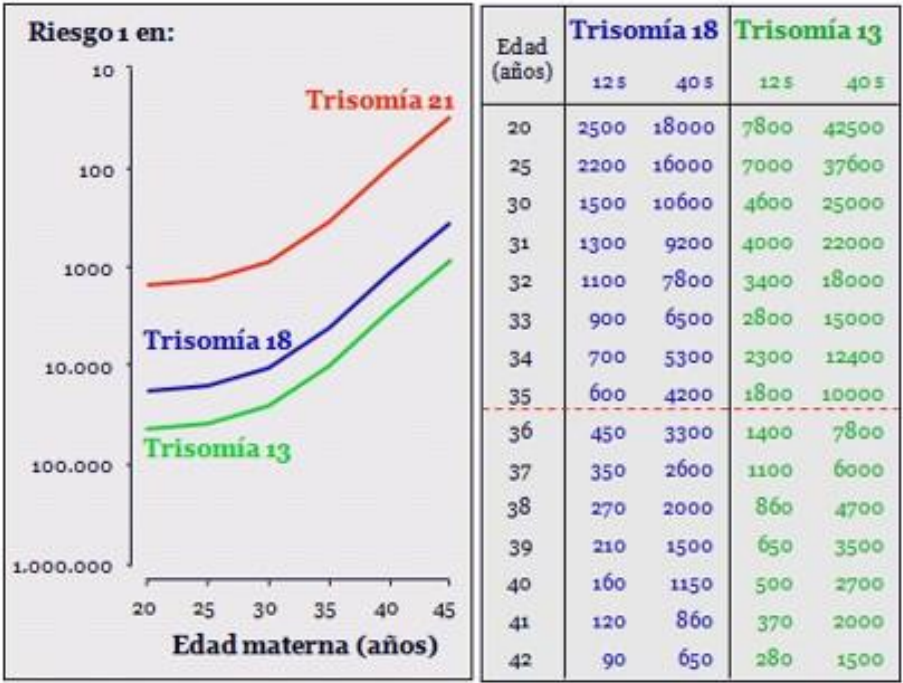


- Trisomía 13 (figura 6) → Síndrome de Patau: también cuenta con retraso mental severo. La esperanza de vida es de pocos meses y tiene una incidencia más baja, 1/22.000 (7).



**Figura 6.** Cariotipo de la Trisomía 13. Figura tomada de Powll-Hamilton y cols. (2020) (13).

El Síndrome de Edward y el Síndrome de Patau se relacionan también de manera exponencial con la edad materna. De forma que a mayor edad materna, mayor será el riesgo de presentar alguna de estas trisomías (Figura 7) .



**Figura 7.** Crecimiento exponencial del riesgo de trisomías 13 y 18 en función de la edad materna. figura tomada de fundación imaterna (2020) (10).

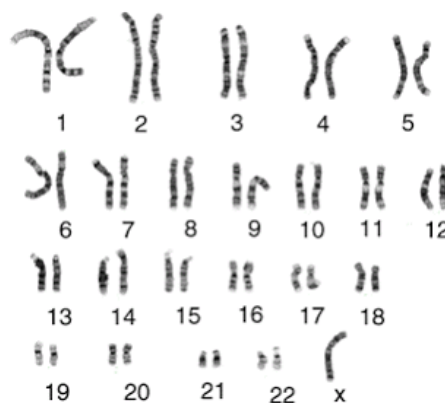
## Gonosomopatías:

Las gonosomopatías son las alteraciones numéricas que se producen en los cromosomas sexuales. A diferencia de las autosomopatías, las aneuploidías en los cromosomas sexuales suelen producir defectos leves en el desarrollo y son mejor toleradas. Esto se debe al bajo contenido en genes del cromosoma Y, y al mecanismo de compensación de dosis del cromosoma X, el cual consiste en la generación de corpúsculos de Barr, permitiendo la heterocromatización específica de uno de los dos cromosomas X. Esto permite dejar sólo un cromosoma X funcional cuando hay más de 2 copias (8).

La incidencia de estas anomalías es relativamente alta y preocupa en el diagnóstico prenatal. Los síndromes asociados son:

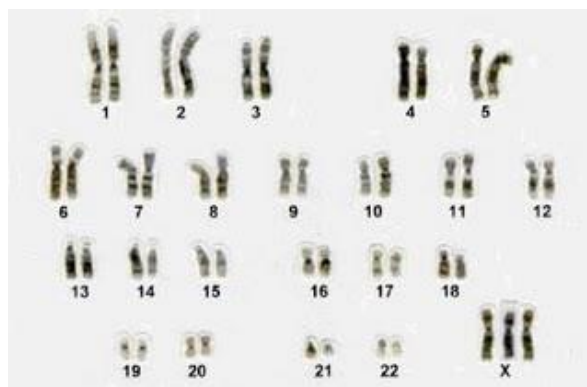
### Aneuploidías con género femenino:

- Síndrome de Turner (45, X) (figura 8): ocurre en 1/4000 nacimientos y son personas de corta estatura, con desarrollo sexual incompleto (infértiles). Además, presentan anomalías renales y cardiovasculares (7).



**Figura 8.** Cariotipo en el Síndrome de Turner. Figura tomada de Rett y cols. (2018) (14).

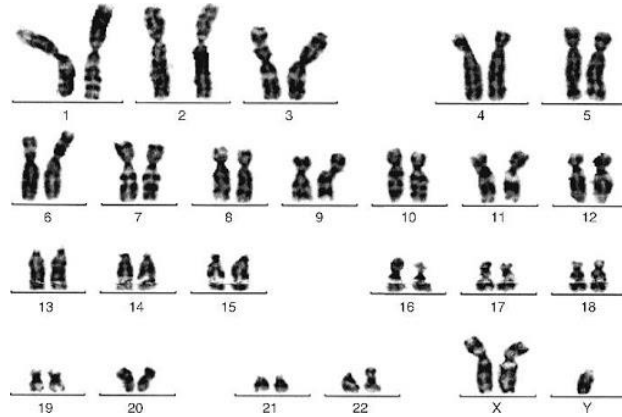
- Síndrome triple X (47, XXX) (figura 9): en 1/1000 nacimientos. Cuenta con un fenotipo leve, bajo peso al nacer y microcefalia. Su capacidad intelectual es un poco por debajo de la media y la infertilidad que conlleva es superior a la media de la población general (7).



**Figura 9.** Cariotipo del Síndrome Triple X. Figura tomada de Imaroca y cols. (2019) (15).

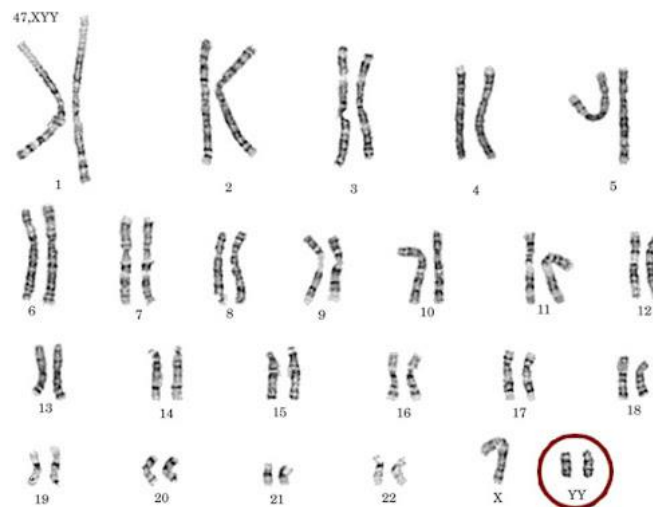
### Aneuploidías con género masculino:

- Síndrome de Klinefelter (47, XXY) (figura 10): aparece en 1/1000 nacimientos. Su fenotipo es leve, con genitales poco desarrollados, capacidad intelectual por debajo de la media e infertilidad (7).



**Figura 10.** Cariotipo del Síndrome de Klinefelter. Figura tomada de Robles y cols. (2013) (16).

- Síndrome de Jacobs (47, XYY) (figura 11): en 1/1000 nacimientos. Son personas de gran altura con fertilidad normal y el fenotipo es prácticamente normal. Algunos de estos varones no conocen su cariotipo (7).



**Figura 11.** Cariotipo del Síndrome de Jacobs. Figura tomada de "A Biología e os desafios da atualidade" (2014) (17).

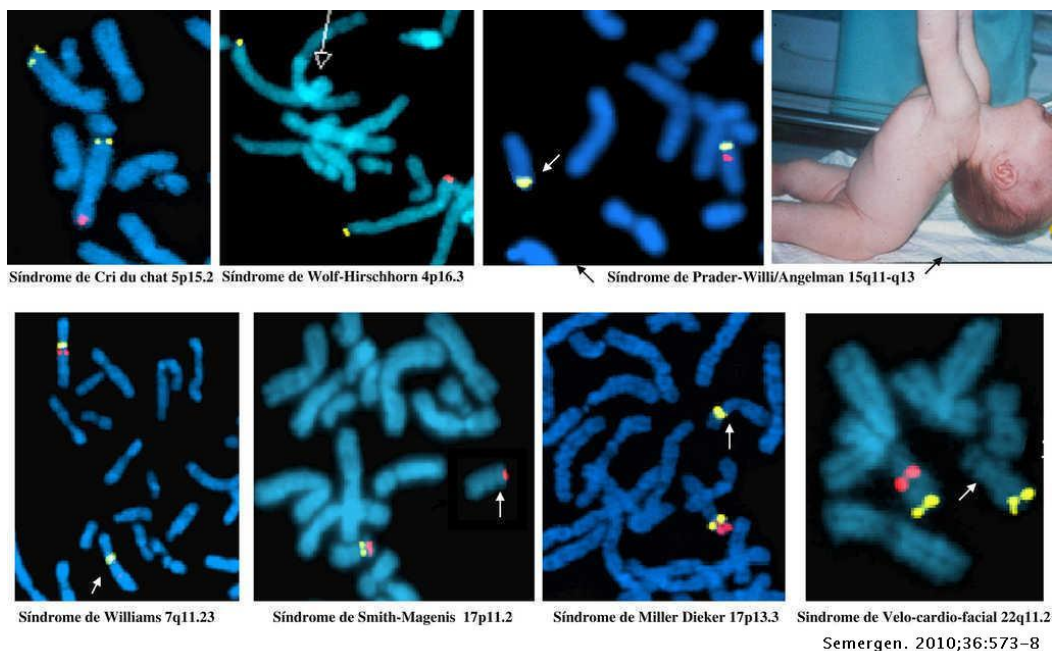
### ALTERACIONES ESTRUCTURALES DE LOS CROMOSOMAS

También destacaremos las alteraciones estructurales producidas en los cromosomas que producen determinados síndromes, como pequeñas deleciones (figura 12) o duplicaciones de regiones concretas del genoma. Son menos frecuentes y bastante difíciles de diagnosticar, ya que al afectar a una pequeña región del genoma es difícil poder observarlas en un cariotipo convencional obtenido por una tinción con Giemsa, requiriendo otras pruebas diagnósticas (18).

Síndromes	Cromosoma y región del mismo que se ha perdido
Wolf-Hirschhorn	4p16,3
Cri du chat	5p15,2
Williams	7q11,23
Prader-Willi/Angelman	15q11-q13
Miller-Dieker	17p13,3
Smith-Magenis	17p11,2
Velo-cardio-facial	22q11,2

**Figura 12.** Síndromes de microdelección más frecuentes. Figura tomada de Martínez y cols. (2010) (19).

Las anomalías estructurales más conocidas son el Síndrome *Cri du Chat* (Síndrome del maullido de gato), que consiste en una delección del brazo corto del cromosoma 5, el síndrome de Di George (delección de la banda 11.2 del brazo largo del cromosoma 22), síndrome de delección 1 p 36 (delección parcial en heterocigosis de la parte distal del brazo corto del cromosoma 1), y por último nombrar el síndrome de Angleman/PraderWilli (delección de la banda 11 del brazo largo del cromosoma 15) (7,18). En la figura 13 vemos diferentes síndromes diagnosticados en primer lugar mediante la realización de una amniocentesis, un cariotipo de alta resolución, y posteriormente aplicando la técnica FISH. Se muestran diferentes síndromes de microdelección. Las flechas indican el cromosoma donde se ha perdido la señal. En la imagen clínica podemos observar la característica hipotonía del síndrome de Prader-Willi (19).



**Figura 13.** Figuras de FISH mostrando diferentes síndromes de microdelección. Figura tomada de Martínez y cols. (2010) (19).

Existen más anomalías estructurales importantes, pero no serán detalladas en este trabajo, ya que por sus características (como se verá más adelante) no pueden ser diagnosticadas a partir del análisis del ADNfe en sangre materna.

Si hacemos una revisión de las anomalías detectadas más frecuentemente en mujeres gestantes, por ejemplo, a través de la memoria de Seguimiento del Programa de Detección Prenatal de Anomalías Cromosómicas del Servicio Cántabro de Salud, realizada en 2019, podemos ver que la anomalía más frecuente es la del Síndrome de Down, seguida de las otras dos aneuploidías. En relación con las anomalías estructurales, sólo se han detectado dos isocromosomas, correspondientes a los cromosomas 9 y 18 (Figura 14).

Cariotipos/Array-CGH	Anomalías cromosómicas detectadas (Nº= 25)	
	Nº	%
Síndrome de Down (Trisomía 21)	16	64
Síndrome de Edwards (Trisomía 18)	1	4
Síndrome de Patau (Trisomía 13)	1	4
Síndrome de Turner (X0)	3	12
Triploidia	2	8
46, XX, i(18)(q10)	1	4
47, XX,+i(9)(p10)Tetrasomía 9p	1	4

**Figura 14.** Datos correspondientes a nacimientos ocurridos en 2018. Figura tomada de Movellán y cols. (2018) (4).

En seguimientos de años anteriores (a continuación, se muestra otro ejemplo de la memoria de seguimiento de 2018) (Figura 15), se observa la misma tendencia. De nuevo, el Síndrome de Down es la aneuploidía detectada en un mayor número de casos. En relación con las anomalías estructurales, se han detectado una delección en el cromosoma 5 (Síndrome de Cri du chat) y una translocación robertsoniana en un progenitor que ha dado como origen a un caso de Síndrome de Down por traslocación.

Cariotipos	Anomalías cromosómicas detectadas N= 29	%
Síndrome de Down (Trisomía 21)	23	82,75
Síndrome de Down (46, XY, der(14;21) +21)	1	
Síndrome Edwards (Trisomía 18)	2	6,89
Síndrome de Patau (Trisomía 13)	2	6,89
46, XY, del(5)(p13p15.1)	1	3,44

**Figura 15.** Frecuencia de las diferentes anomalías cromosómicas. Figura tomada de Movellán y cols. (2018) (4).

## **2. OBJETIVO**

El objetivo de esta revisión es conocer las intervenciones llevadas a cabo actualmente sobre la detección prenatal de anomalías genéticas en sangre materna en el Sistema Público de Salud en España, así como sus limitaciones y perspectivas futuras.

### **3. METODOLOGIA**

Se ha llevado a cabo una revisión narrativa para la que se realizó una búsqueda bibliográfica de artículos científicos incluidos en las bases de datos de Ciencias de la Salud: Pubmed®, Cuiden®, Cochrane Library® y Scielo®. Para realizar la búsqueda bibliográfica se utilizaron las siguientes palabras clave a través de dos tesauros con lenguaje controlado combinado con los operadores booleanos AND, OR y NOT.

- Descriptores en Ciencias de la Salud (DeCS): Diagnóstico prenatal no invasivo, ADNfe en sangre materna, Secuenciación masiva, Edad materna avanzada.
- Medical Subject Headlines (MeSH): Non-invasive prenatal diagnosis, fetal DNA in maternal blood, massive sequencing, advanced maternal age.

En todas las bases de datos se han usado términos similares del lenguaje libre en inglés o español. La búsqueda se limitó a artículos publicados entre los años 2012 y 2020 y en un lenguaje escrito en inglés o español.

Asimismo, se realizó una búsqueda manual de las referencias de los artículos incluidos y una búsqueda en Google Académico empleando lenguaje libre como: “Diagnóstico prenatal”, “PCR digital”, “Secuenciación de segunda generación”, “Estadísticas de edad materna”

Por otro lado, se realizó una búsqueda de libros y artículos de la Biblioteca de la Facultad de Medicina de la universidad de Cantabria.

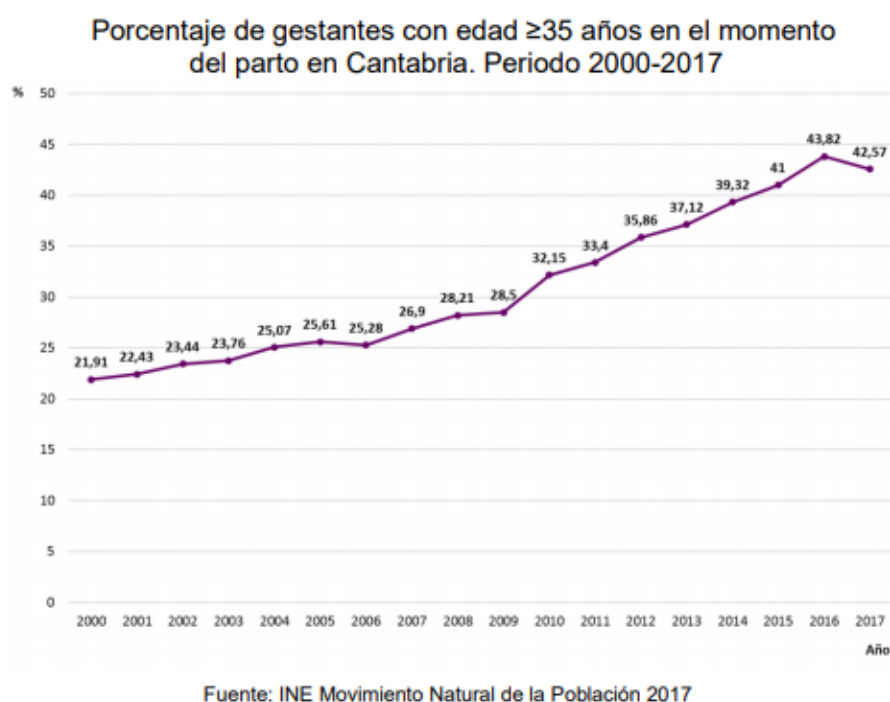


## 4. RESULTADOS

### 4.1. Importancia de la edad materna en las enfermedades genéticas

En una encuesta realizada en 2018 por el INE se ve reflejado como el 79,2% de las mujeres de 25 a 29 años aún no ha tenido hijos, reduciéndose hasta un 52% en el grupo de edad de 30 a 34 años (siendo este el grupo de mayor fecundidad) y al 27,8% en el grupo comprendido entre los 35 y 39 años (20). La mayoría de estos grupos de mujeres reflejan también en esta encuesta que han retrasado la edad considerada por ellas como ideal para la concepción de sus hijos. Los principales motivos del retraso de la maternidad son las razones laborales y la conciliación del trabajo con la vida familiar, el no tener una relación sentimental estable, o el no sentirse lo suficientemente preparadas para ello (20).

En Cantabria también se ha observado un aumento progresivo de la edad materna (Figura 16). Esto quiere decir que según pasan los años, las mujeres deciden ser madres más tarde en comparación a épocas pasadas, donde la decisión de tener un hijo era mucho más temprana. Esto se ve reflejado en el aumento de 4,4 años en la edad media de las mujeres gestantes, pasando de una edad media de 24,4 años en mujeres nacidas en los años 60, a los 28,8 años en las nacidas en los años 70 (21).



**Figura 16.** Evolución del número de mujeres gestantes con una edad superior a 35 años. Figura tomada de Movellán y cols. (2018) (4).

Estos datos son importantes debido a que se ha observado en diferentes estudios que el aumento de la edad materna está asociado a un incremento de aparición de anomalías cromosómicas numéricas (22). En relación al Síndrome de Down, por ejemplo, esta probabilidad es de 1 de cada 250 en gestantes con más de 35 años (5).



#### 4.2. Técnica combinada de cribado

En el protocolo establecido antes del 2010 se realizaban amniocentesis a todas las mujeres gestantes mayores de 35 años. Se eligió esta edad porque a partir de los 35 años el riesgo de tener un bebé con una anomalía cromosómica era superior al riesgo de pérdida del bebé por la punción, pero esta técnica dejó de ser aplicarse (23) debido a que, como ya hemos comentado, cada vez hay más mujeres que tienen su primer hijo a partir de los 35 años (20). La técnica supone un riesgo importante para el embarazo y es muy costosa. De esta manera, la técnica combinada de cribado surgió con la idea de reducir el número de amniocentesis realizadas (1,23).

La prueba de cribado combinada, como su propio nombre indica es una técnica de cribado que trata de detectar a mujeres gestantes con un mayor riesgo de tener un feto con anomalías genéticas (5), de forma que puede establecerse un determinado riesgo atribuido individualmente a cada embarazo (5,23).

A finales de los años 90 se descubrió que aquellos embarazos con alteraciones genéticas cambiaban determinados marcadores bioquímicos y aparecían ciertas alteraciones séricas en sangre materna con las que se puede detectar cierto riesgo (4,8). Los dos más utilizados son:

- Fracción libre de Gonadotropina coriónica humana ( $\beta$ CGH libre): los niveles en sangre materna aumentan en los embarazos con trisomía 21 y disminuyen en los embarazos con trisomías 18 y 13.
- Proteína A plasmática asociada al embarazo (PAPP-A): los niveles en sangre materna disminuyen en los embarazos con cualquiera de las tres trisomías.

De esta forma, con un análisis de sangre podemos detectar embarazos de alto riesgo y descartar los de bajo riesgo (5). Los niveles de estos marcadores bioquímicos se normalizan durante el embarazo, por lo que se deben estudiar durante el primer trimestre. Normalmente se miden en la semana 10 de gestación (4). Los niveles sanguíneos de estas proteínas también dependen de algunos factores maternos como el peso, el tabaquismo, la diabetes, el origen étnico, el parto gemelar o la fecundación in vitro. Todas las variables se computan en un algoritmo para calcular el riesgo (18).

Además, existen determinadas alteraciones ecográficas como son la medición de la translucencia nuchal y la cantidad de líquido acumulado debajo de la piel en la nuca del feto que también permiten detectar anomalías cromosómicas (18,24), de forma que se observan aumentos significativos de la acumulación de este líquido debajo del pliegue de la nuca. Esta prueba ecográfica debe ser realizada entre las 11-13 semanas de gestación (5).

Según todo lo explicado, desde el 2010 se realiza un cribado de rutina en todos los embarazos debido a que es una prueba que no conlleva ningún riesgo para la gestante ni para el bebé (23). Además, es sencillo ya que no aumenta el número de controles ni visitas y es rápido. Es una prueba muy sensible, pero es poco específica, es decir, aparecen una gran cantidad de falsos positivos y es muy importante explicar a los progenitores que es una prueba de cribado y que no sirve para confirmar si el bebé tiene

una determinada anomalía, sino que sirve para seleccionar a aquellas gestantes con un mayor riesgo (1,5).

Dependiendo del riesgo obtenido, el asesoramiento de los progenitores será distinto:

- Un índice de riesgo bajo (por debajo de un punto de corte establecido en 1/270) significa que la posibilidad de que exista una anomalía cromosómica es pequeña y por lo tanto no está justificado la realización de más pruebas diagnósticas (esta es la situación del 95% de las gestantes). Es importante saber que un índice de riesgo bajo no excluye definitivamente que el feto pueda presentar una alteración cromosómica. Cuando el riesgo es bajo no se proponen más pruebas y se continua con la vigilancia habitual del embarazo (1,5).
- Sin embargo, cuando tenemos un índice de riesgo alto (por encima del punto de corte) (en esta situación se encuentra el 5% de los embarazos), es necesario informar a los progenitores y remitirles al Servicio de Citogenética del Hospital de referencia, en este caso el Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (HUMV). En el hospital se completará la información y se ofrecerá un asesoramiento adecuado según las circunstancias de embarazo, ofreciendo a la mujer gestante la posibilidad de realizar una prueba de cribado con más sensibilidad como es el estudio de ADNfe en sangre materna o la realización de una prueba invasiva (amniocentesis) para confirmar el diagnóstico (1,5).

#### 4.3. Análisis de ADNfe en sangre materna

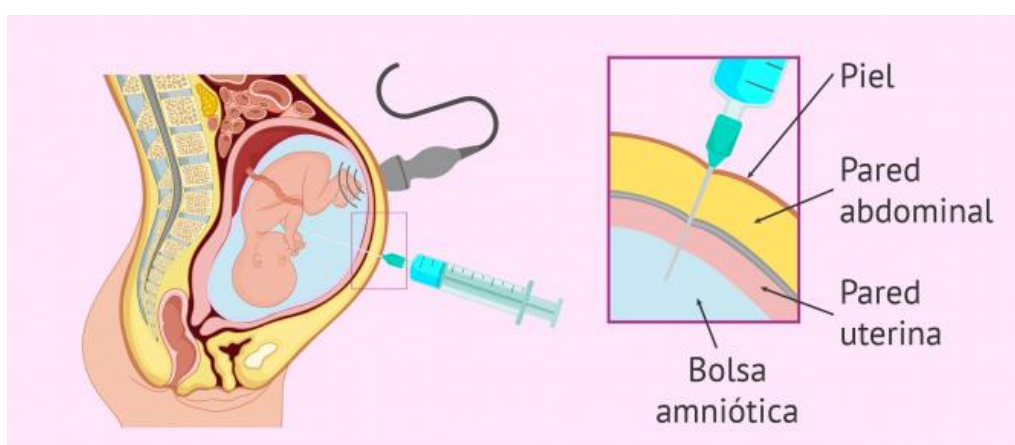
Durante la gestación, el trofoblasto, que es el grupo de células que forma la capa externa del blastocisto encargado de proveer de nutrientes al embrión y que posteriormente formará la placenta, sufre muchos cambios. Las células mueren y son remplazadas por otras más jóvenes, y en este proceso de cambio se desprenden fragmentos de ADN libre que pasan a la circulación materna a través de la placenta, los cuales pueden ser objeto de estudio mediante técnicas de análisis molecular (14).

La detección prenatal de anomalías genéticas por un análisis en sangre materna es una técnica no invasiva que nos sirve para diagnosticar posibles defectos existentes en el ADNfe antes del nacimiento, consiguiendo minimizar riesgos ya que se realiza haciendo una extracción de sangre a la madre para posteriormente analizarla (1,23).

En este caso debemos informar a los progenitores de que se trata de un test de cribado que se realiza a partir del análisis del ADNfe presente en sangre materna y cuyo propósito es establecer con alta probabilidad (99%) si el feto presenta alguna de las trisomías de riesgo (21, 18 o 13) (1,24) o algunas deleciones y duplicaciones como veremos más adelante. No es una prueba diagnóstica, si no de cribado. Ante un resultado positivo deberíamos informar a la gestante de la posibilidad de realizar técnicas invasivas para la confirmación del diagnóstico. Como prueba invasiva de elección tenemos la amniocentesis, con el fin de obtener líquido amniótico del cual poder extraer ADNfe para su estudio (1). Por último, hay que comentar que la prueba de análisis de ADNfe en sangre materna no presenta ningún tipo de riesgo para el feto

ya que solo se necesitan 10 mL de sangre materna. Sólo en un pequeño porcentaje de los casos (1-7%) no es posible obtener suficiente ADNfe para determinar el riesgo y es necesario repetir la extracción de sangre (esto ocurre sobre todo en mujeres obesas) (1,24). De ser la prueba negativa (riesgo bajo) no se ofrecerá a las madres ninguna prueba diagnóstica invasiva (1,5).

Si tras toda la información ofertada se acepta la realización del estudio de ADNfe en sangre materna, se debe entregar un documento de Consentimiento Informado para su firma por la gestante y el profesional en cuestión, quien deberá entregar además el documento para solicitar la analítica en el hospital (1). La gestante puede optar también, tras dar un asesoramiento genético adecuado, a realizar una amniocentesis, asumiendo los riesgos que lleva asociada la realización de esta prueba, como es el aborto postpunción que ocurre en 1 de cada 100 mujeres gestantes sometidas a una amniocentesis diagnóstica (figura 17) (1,23).



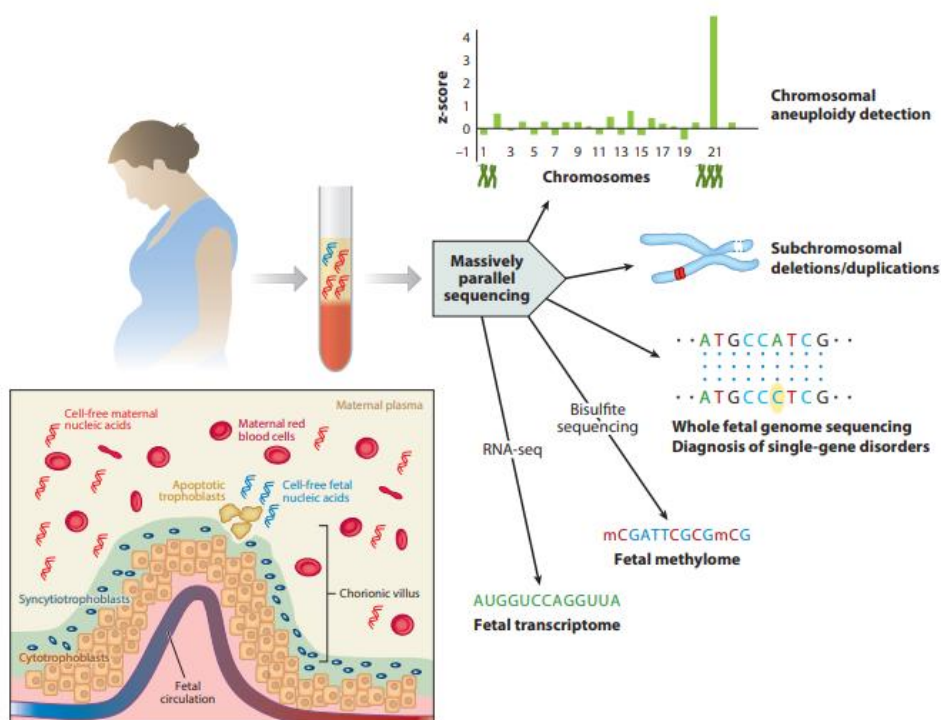
**Figura 17.** Amniocentesis ecoguiada. Figura tomada de Rogel y cols. (2020) (25).

#### 4.4. Tipo de muestra

En 1997, un grupo de investigadores consiguió demostrar la presencia de ADNfe en sangre materna realizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con cebadores específicos del cromosoma Y en mujeres gestantes de un feto varón (2). Un año después, este mismo grupo puso en evidencia que la concentración del ADNfe que se encontraba en sangre materna era muy similar en plasma y suero, aunque había mayor contenido de ADN materno en el suero, lo que resultaba en una detección menos eficiente del ADNfe. Esta es la razón por la que se prefiere el plasma materno para fines diagnósticos del ADNfe (2). Además, utilizando la PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) fueron capaces de determinar que la concentración de ADNfe en plasma materno era de un 3,4% en gestaciones tempranas y de un 6,2% en gestaciones tardías (2).

A pesar de encontrar diferentes tipos celulares en sangre materna (como trofoblastos, leucocitos, glóbulos rojos inmaduros y eritrocitos), la cantidad de ADNfe libre es superior al que podría ser extraído del componente celular de estas células encontradas en sangre materna (2). Por este motivo se prefiere el uso de este ADNfe libre para su uso diagnóstico.

El origen del ADNfe en sangre materna se justifica por la apoptosis de las células hematopoyéticas fetales, la transferencia de ADN libre de células fetales a través de la placenta y la destrucción trofoblástica, siendo esta última la más importante (2). La destrucción trofoblástica genera fragmentos apoptóticos de este ADNfe que se incluyen en microvesículas, lo cual está asociado a una constante renovación de este trofoblasto. Estas microvesículas y células fetales son eliminadas rápidamente de la sangre materna después de la expulsión de la placenta (figura 18) (2).



**Figura 18.** Liberación de ADNfe a sangre materna y aplicaciones en el test prenatal no invasivo. Figura tomada de Wong y cols. (2016) (26).

El tiempo de detección del ADNfe en sangre materna abarca desde la 4-5ª semana de gestación hasta el parto. El ADNfe comprende solo una pequeña porción del ADN total libre, que es cercano al 10-20% en las últimas semanas de gestación (2,3).

Es importante destacar que la cantidad de ADNfe circulante depende de diversos factores como son, además del periodo de gestación y la progresión del embarazo, la presencia de enfermedades maternas, el peso corporal, aneuploidías y embarazos gemelares (2). En cualquier caso, la escasa cantidad de ADNfe en sangre materna requiere técnicas muy específicas para su detección. Es necesario un tamaño mínimo de 150-300 pares de bases para que el genoma fetal completo se vea representado (el 99% del ADN derivado del feto tiene menos de 313 pares de bases) (2).

La estabilidad del ADNfe libre en sangre materna favorece su extracción, permitiendo un mejor rendimiento y facilitando enormemente los análisis diagnósticos (2). Afortunadamente, a pesar de ser muy estable, se elimina rápidamente después del parto, evitando así efectos de confusión en siguientes embarazos.

En cuanto a la obtención de la muestra, la extracción de sangre se realiza en un tubo de extracción la sangre de vacío con EDTA (anticoagulante especial para la preservación del ADN) (1). El envío de la muestra al laboratorio se hace según las recomendaciones de conservación de la muestra. La estabilidad del ADNfe se mantiene teniendo especial cuidado durante la purificación y manipulación, además de manteniendo un correcto almacenamiento. Se recomienda almacenado a 80°C. La muestra también se ve afectada por la temperatura de almacenamiento de la sangre antes de la preparación del plasma, sugiriéndose 4°C como temperatura óptima (2). Finalmente, la recogida de esta muestra se tramita previo aviso al centro hospitalario y debe hacerse junto con el documento de Consentimiento Informado (1).

#### 4.5. Tecnologías aplicadas al diagnóstico prenatal en sangre materna

Gracias al descubrimiento del ADNfe libre en sangre materna se consiguieron desarrollar diversas técnicas de análisis molecular por las cuales somos capaces de realizar un diagnóstico prenatal a partir de una muestra de sangre. Así se diseñó el test de secuenciación de ADNfe libre (24).

Este estudio requiere de alta tecnología, así como de un laboratorio de genética especializado y validado en la técnica, que debe contar con profesionales con amplia experiencia en la realización de estos estudios (1). Actualmente, por lo tanto, se considera más costo-efectivo realizar estos test en laboratorios externos que estén especializados (1).

Debemos tener presente que en el torrente sanguíneo de la madre también existe ADN libre de la madre. Por lo tanto, antes de comenzar la secuenciación tenemos que comprobar que la fracción libre de ADNfe supera un umbral mínimo detectable (2,24). De media es aconsejable esperar hasta la décima semana para obtener un porcentaje mínimo procedente del feto, pero en mujeres con desordenes metabólicos, obesidad o gestación por reproducción asistida, la fracción de ADNfe libre tiende a ser menor que en una mujer sin estos condicionantes (24).

##### 4.5.1. Purificación y enriquecimiento del ADNfe

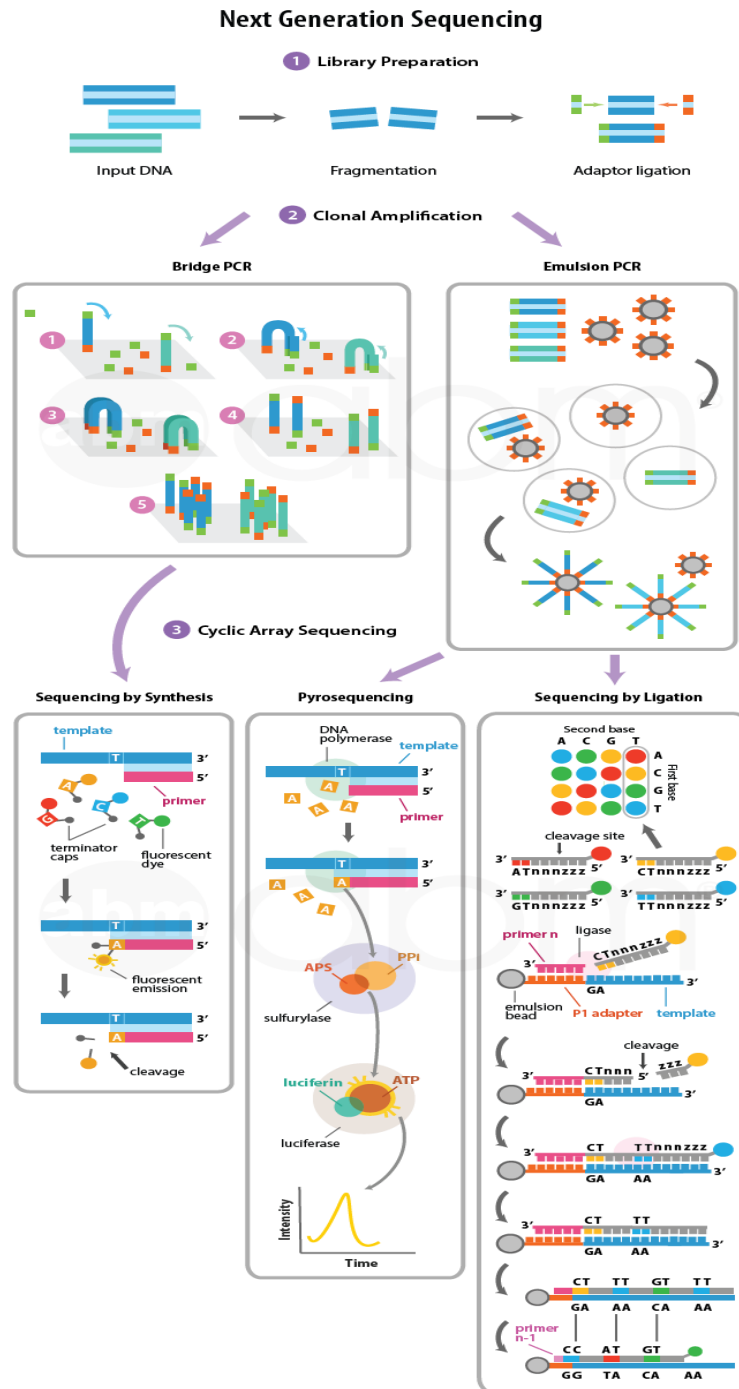
Para la correcta realización del estudio es importante que llevemos a cabo técnicas de purificación y de enriquecimiento del ADNfe libre (2). Para dichas técnicas de purificación disponemos de diferentes kits comerciales de extracción de ADN. Los más utilizados en la actualidad son el kit de ácido nucleico circulante QIAamp® (Qiagen, Venlo, Países Bajos) y el kit QIAamp® DSP Virus Spin (Qiagen) (2). Las estrategias de enriquecimiento para aumentar el ADNfe libre o las células fetales del plasma materno, son muy importantes, ya que el ADN materno circulante interfiere con la sensibilidad y la detección de las características genéticas fetales. Además, se ha demostrado que la purificación de las fracciones circulantes de ADNfe de menor peso molecular (100-300 pb) por electroforesis en gel de agarosa mejora la detección de mutaciones puntuales, así como de otras actividades de genotipado fetal (2). Es decir, esta técnica de enriquecimiento nos permite aumentar la fracción de ADNfe de la que disponemos para facilitar posteriormente las técnicas de diagnóstico.

#### 4.5.2. Diagnóstico prenatal no invasivo basado en ADNfe libre basado en secuenciación de nueva generación (NGS)

Para llegar a realizar un diagnóstico prenatal no invasivo a partir del ADNfe libre precisamos de la realización de técnicas de análisis molecular (2).

El concepto de secuenciación de alto rendimiento o de nueva generación (o Next Generation Sequencing, NGS), engloba todas las tecnologías destinadas a llevar a cabo la secuenciación masiva a gran escala de cualquier ácido nucleico (27). Desde que el Proyecto Genoma Humano fue completado, muchos científicos han estado investigando sobre una manera de realizar una secuenciación masiva con menor tasa de error, de forma más rápida y barata. En 2005 se comenzaron a comercializar las primeras tecnologías de NGS, lo que supuso una gran revolución en este campo. Esto fue gracias a que estos sistemas generaban una mayor cantidad de lecturas del genoma obteniendo resultados más sólidos, con precios más bajos y en menos tiempo (27,28). Estos sistemas también reciben el nombre de “High-throughput DNA sequencing” o “Massively Parallel Sequencing”.

Existen diferentes plataformas que nos permiten realizar la secuenciación de segunda generación que se basan en diferentes principios técnicos (como la secuenciación por síntesis, la pirosecuenciación, la secuenciación por ligadura y la secuenciación de semiconductores de iones) pero con características en común (figura 19) (2).



**Figura 19.** Similitudes y diferencias entre las diferentes plataformas de NGS. Figura tomada de tony abm y cols. (2020) (29).

Las aplicaciones de la NSG en la práctica clínica con fines diagnósticos, incluyen: la secuenciación del genoma completo y la secuenciación de capturas selectivas de genes, regiones concretas o de todas las regiones codificantes o exoma (28).

La captura selectiva para NGS está indicada para enfermedades que están causadas por mutaciones en varios genes diferentes (heterogeneidad de locus), cuando ya son bien conocidos los genes involucrados. Se han desarrollado paneles de captura y NGS para diversas enfermedades. Las capturas selectivas combinan tecnologías de selección por



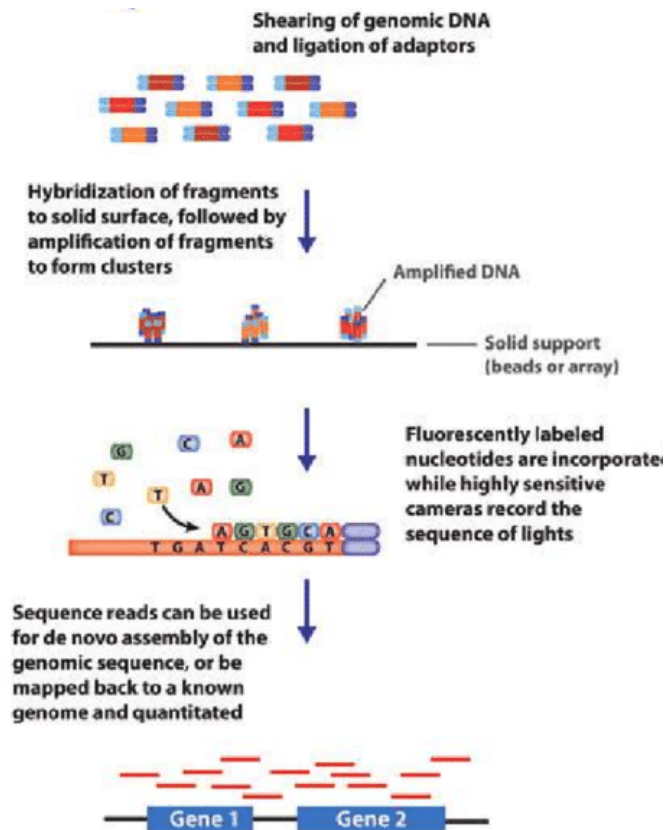
hibridación seguidas de la secuenciación de las regiones seleccionadas. Esto sirve para minimizar el coste final de la secuenciación, ya que secuenciar gen a gen sería muy costoso; a la vez que reduce la complejidad del análisis. Sin embargo, las variantes detectadas por NGS suelen todavía ser confirmadas mediante otros métodos posteriormente para darles validez diagnóstica (28).

El exoma se refiere a las regiones codificantes y reguladoras de todos los genes del genoma que son funcionales, como proteínas o RNAs. Esto supone el 1-1,5% del genoma completo. La secuenciación del exoma es una buena manera de buscar mutaciones que son causantes de enfermedades mendelianas además de reducir la cantidad de material genético a secuenciar. Se considera que el 85% de las mutaciones causantes de enfermedad se localizan en el exoma. La secuenciación del exoma está indicada para detectar mutaciones responsables de enfermedades con gran heterogeneidad genética y/o fenotípica (28).

En lo relativo a la secuenciación del genoma completo, es la técnica que mayor cantidad de información puede aportarnos. La NSG obtiene información de las regiones codificantes y de las no-codificantes, además de contar con gran efectividad para detectar variaciones estructurales del genoma. Por ahora su uso en el ámbito clínico sólo se ha aplicado a casos específicos, aunque se espera que las indicaciones clínicas aumenten de manera progresiva ya que ya existen datos que indican una utilidad clara con mejoría del rendimiento frente a los sistemas de captura, además de ser capaces de detectar variantes estructurales del genoma incluyendo puntos de rotura de algunos reordenamientos equilibrados (28).

Todas estas plataformas de secuenciación necesitan una biblioteca de pequeños fragmentos que se obtienen con diferentes enfoques químicos o enzimáticos (2). El tamaño de los fragmentos es importante de cara a la lectura posterior, porque cuanto mayor sea la secuencia, el fragmento también será mayor, y será más fácil el ensamblaje en el análisis (27). En los extremos de dichos fragmentos se une un adaptador que se usará posteriormente tanto para la amplificación clonal como para la reacción de secuenciación. También es usado para obtener una señal que sea fácilmente medible, como por ejemplo, intensidad de fluorescencia o diferencia de pH que nos haga posible discriminar entre una muestra y otra (figura 20) (2). Todas las plataformas de NGS tienen en común que la detección del ácido nucleico no es aplicable a una única molécula si no que es importante realizar una amplificación del fragmento a secuenciar para poder obtener lecturas secuenciadas del mismo. Este proceso puede llevarse a cabo por distintos procesos de PCR en emulsión o PCR puente (27). Mediante la amplificación se generan distintos grupos de ADN, cada uno de ellos genera un solo fragmento de la biblioteca, los cuales después se leen ópticamente a partir de repetidos ciclos de incorporación de nucleótidos (2). La intensidad de cobertura es el número de veces que una base del genoma ha sido secuenciada, y cuanto mayor es la cobertura, mayor es la fiabilidad del método evitando los falsos positivos y negativos (28). Al final de la secuencia, todas las lecturas generadas se analizan mediante herramientas bioinformáticas alineándose con un genoma de referencia conocido (2).





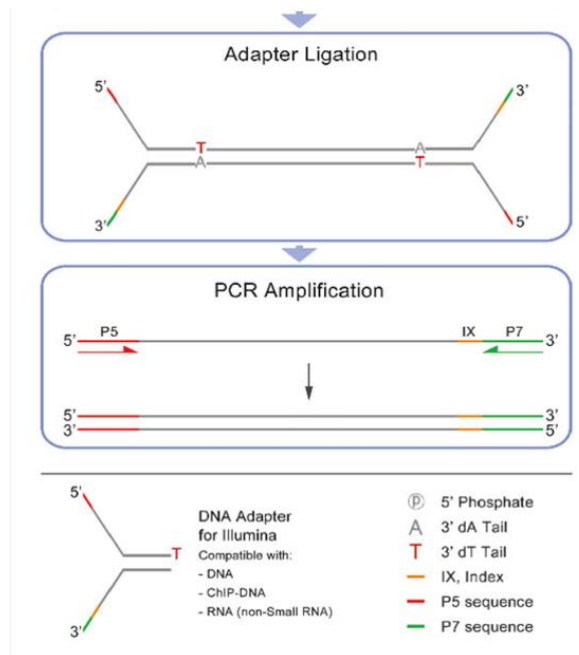
**Figura 20.** Comparación entre secuenciación Sanger y secuenciación de nueva generación. Figura tomada de Bunnik y cols. (2013) (30).

LA NGS supuso un gran avance en el diagnóstico prenatal ya que ha permitido detectar numerosas enfermedades, como la detección de aneuploidías y otras enfermedades genéticas, a partir de una muestra de plasma materno. Mediante la secuenciación del ADN se secuencian fragmentos especialmente enriquecidos para las regiones de interés, y tras su alineamiento con el genoma de referencia y análisis informático se determina si existe un exceso o déficit de secuencias de un cromosoma entero o una porción de este. Tiene una alta sensibilidad y especificidad: 99,5% con 0,1% de falsos positivos para la trisomía 21; 97% y 0,1% para la trisomía 18; y 79% y 0,1% para la trisomía 13. Al ser aún una prueba de cribado, un resultado positivo deberá confirmarse mediante una prueba invasiva (28).

Las plataformas de NGS son múltiples y variadas. Cada una de ellas tiene sus propias ventajas y desventajas. Es por tanto una decisión crítica en la actualidad para los científicos y laboratorios, el tener que elegir la plataforma de NGS que mejor cubra la necesidad de la actividad que se quiere desempeñar. Algunos ejemplos de estas plataformas son Illumina, Ion Torrent Sequencing, SOLiD (Support Oligonucleotide Ligation Direction), 454 Life Sciences, Roche 454 etc. (27,28).

Pondremos como ejemplo la plataforma de Illumina, ya que actualmente es la más utilizada. Los pasos principales en la secuenciación son: preparación de la biblioteca, secuenciación y análisis de datos (31). Tras la extracción y purificación de ADN (sección 4.5) la preparación de la biblioteca es crucial para el éxito de la secuenciación (figura 21). Generalmente estas bibliotecas son creadas fragmentando el ADN y agregando

adaptadores especializados a ambos extremos. Durante la unión del adaptador, se agregan secuencias índice únicas o “códigos de barras” a cada biblioteca, que posteriormente se utilizarán para distinguir entre las bibliotecas durante el análisis de datos (31).



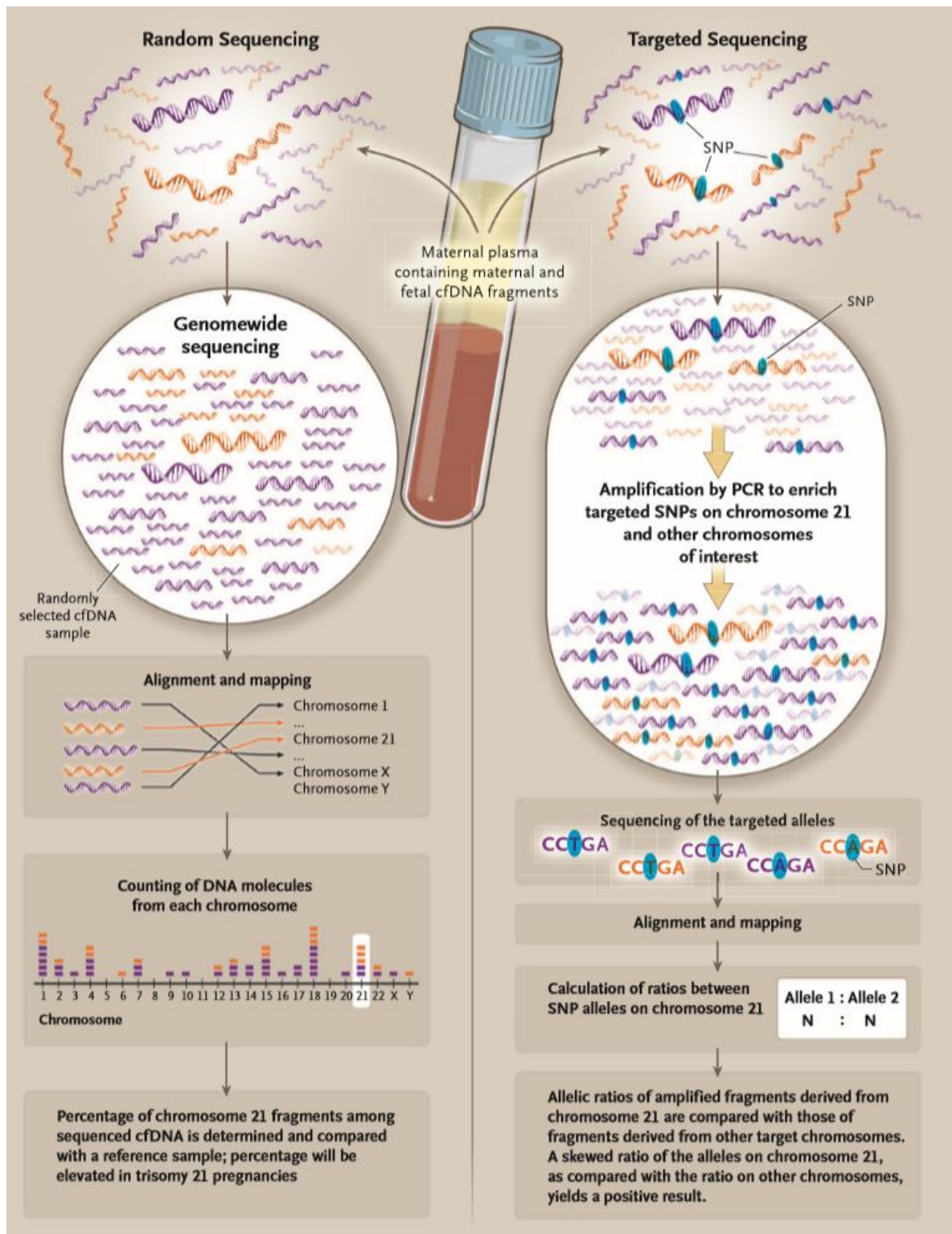
**Figura 21.** Preparación de la biblioteca. Figura tomada de Clinisciences for Illumina® (2020) (32).

Las bibliotecas se cargan en una celda de flujo y se colocan en el secuenciador. Los fragmentos de ADN se amplifican en un proceso llamado generación de grupos, obteniéndose millones de copias de ADN monocatenario. En concreto en Illumina utilizan un proceso llamado secuenciación por síntesis (SBS), donde los nucleótidos modificados químicamente se unen a la cadena de la plantilla de ADN a través de la complementariedad natural de los nucleótidos. Cada uno de estos nucleótidos lleva una etiqueta fluorescente y un terminador reversible que bloquea la incorporación de la siguiente base. La señal fluorescente indica que nucleótido se ha agregado, y el terminador se escinde para que se pueda unir la siguiente base. Después de leer la cadena de ADN hacia adelante, se eliminan las lecturas y el proceso se repite para la lectura de la cadena inversa. Este proceso recibe el nombre de secuenciación de extremo emparejado (31).

Para finalizar, realizaremos el análisis de datos. El software del aparato de NSG identifica los nucleótidos mediante un proceso que recibe el nombre de llamada base, e indica la precisión que debe tener cada una de esas llamadas base. Hoy en día se pueden usar aplicaciones de análisis de datos NGS sin ser necesario tener una formación en bioinformática o requerir de personal de laboratorio adicional para esta interpretación (31).

#### 4.6. Aplicación de las técnicas de secuenciación NGS en la determinación de aneuploidías a partir de ADNfe en sangre materna

A partir de una muestra de sangre materna se identifican los ácidos nucleicos que provienen del feto y se reconstruye a grandes rasgos su genoma, para lo cual se realizan dos aproximaciones. Lo primero es realizar una secuenciación completa para determinar cuántos fragmentos hay de cada par de cromosomas. Se cuenta el número de moléculas de ADN perteneciente a los diferentes cromosomas humanos. En este paso podemos analizar si existen más copias de las debidas de un determinado par de cromosomas (trisomía) o si tenemos una sola copia y falta un cromosoma (monosomía) (figura 22, izquierda). Por ejemplo, en un embarazo que involucre una trisomía del cromosoma 21, esperamos que la proporción de moléculas de ADNfe sea mayor que un conjunto de datos de referencia basado en muestras de mujeres que llevan fetos euploides (24). Después de esto se realiza una secuenciación dirigida. En aquellos casos en los que sea necesaria la búsqueda de una mutación puntual de herencia paterna, en la secuenciación se buscan polimorfismos de un único nucleótido (SNPs), que son secuencias concretas de cada uno de los cromosomas. De esta forma se observan secuencias concretas de cada uno de los cromosomas de interés donde sabemos que aparecen determinadas secuencias heredables. Es una técnica más fina que nos permite tener una conclusión de la dotación fetal con el recuento de polimorfismos clasificándolas según el cromosoma al que pertenecen y el progenitor del que han sido heredadas (figura 22, derecha). En esta secuenciación se amplifican y secuencian 6 polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) en los cromosomas de interés. Las proporciones entre alelos heterocigotos de SNP se comparan con las de otros cromosomas específicos. Se espera un sesgo de las proporciones cuando hay aneuploidía de un cromosoma en concreto (24).



**Figura 22.** Secuenciación del ADNfe durante la gestación. Figura tomada de Bianchi y cols. (2018) (24).

Recientemente, el espectro de anomalías cromosómicas que pueden ser diagnosticadas mediante el test prenatal en sangre materna se ha expandido enormemente. La mayoría de las pruebas de ADNfe de rutina evalúan el sexo fetal y las aneuploidías cromosómicas más comunes. Algunos laboratorios informan también de variantes en el número de copias, incluidos los síndromes de microdeleción y microduplicación. La incidencia de

estos síndromes, así como el potencial para proporcionar tratamientos neonatales tempranos, son las principales consideraciones citadas por los laboratorios que defienden estas pruebas ampliadas, aunque si bien es verdad que para éstos aún se requiere con frecuencia el uso de evaluaciones adicionales debido al mayor porcentaje de falsos positivos en el diagnóstico de estos síndromes. A pesar de la expansión de la capacidad diagnóstica de diferentes anomalías genéticas, aun hoy en día este test no nos permite diagnosticar determinadas anomalías como son traslocaciones e inversiones, para las cuales, como veremos más adelante, es necesario utilizar otros métodos diagnósticos, como la realización de un cariotipo y un FISH, requiriendo pruebas diagnósticas invasivas (24).

#### 4.7. ¿En qué contexto se aplica en la sanidad pública?

La detección prenatal no invasiva de anomalías genéticas en sangre materna es una prueba de cribado para detectar aneuploidías que, en la Sanidad pública, se utiliza sólo en mujeres que presentan un elevado riesgo de presentar dichas anomalías. Por lo tanto, deben establecerse ciertos criterios para poder ofertar este método de cribado de forma costo-efectiva. El actual protocolo recoge todas las condiciones para la aplicación clínica de este método de cribado reduciendo las técnicas invasivas innecesarias y reduciendo también las desigualdades en salud, ya que hasta la realización de este protocolo solo podían optar a este tipo de estudios las mujeres con mayor poder adquisitivo (1,5).

Con la evidencia científica actual, el estudio para la detección de aneuploidías mediante el análisis del ADNfe en sangre materna está indicado en población de alto riesgo de trisomía 21, 18 y 13 (1,3). No se defiende el uso de esta técnica como método diagnóstico, si no como método de cribado (3). Por tanto, según el protocolo de la consejería de Sanidad-Gobierno de Cantabria será ofertada en los siguientes casos:

- Gestante con cribado combinado del primer trimestre de riesgo alto ( $>1/270$ ), siempre que sea una gestación única, no exista malformación fetal mayor ecográfica o la translucencia nuchal esté en el rango de valores normales. En la gestación gemelar se individualizará cada caso debido a la menor sensibilidad de la prueba en estos casos (3).
- Gestante con embarazo previo con aneuploidías en los cromosomas 21, 18 o 13 (3).
- Gestante y/o pareja portadora de anomalía cromosómica equilibrada. Se individualizará el asesoramiento según la anomalía (3).

No se ofertará a aquellas mujeres que rechacen el cribado combinado del primer trimestre y en aquellas que hayan superado las 14 semanas y acudan a control de embarazo se actuará según lo establecido (1).

Cuando se cumpla alguna de las situaciones anteriormente comentadas se remitirá a la gestante a la Unidad de Genética del HUMV donde se llevará a cabo un asesoramiento

pretest, informando a los progenitores acerca de la prueba. Puesto que se trata de una prueba genética, se debe ofrecer asesoramiento genético previo y asegurarse de que la gestante y la pareja han recibido y entendido toda la información apropiadamente (1).

Esta prueba se lleva realizando ya muchos años sin protocolización fuera del Sistema Cántabro de Salud (SCS), ya que según la memoria 2015 del Programa de Detección Prenatal de Anomalías Cromosómicas (PDPAC) al menos un 61,36% de las mujeres con gestaciones evolutivas y cribado prenatal de riesgo no se realizaron una amniocentesis debido a que ya habían realizado de forma privada un test de ADNfe en sangre materna que resultó negativo (1).

Hoy en día, existen muchos laboratorios que ofrecen estos tipos de test de forma privada como son: Biogen Center, neoBona SynLab, Laboratorio Echevarne, Imegen, Labco Nous, etc.

Estos laboratorios ofrecen distintos tipos de estudios que incluyen detección de diferentes enfermedades. Como ejemplo a continuación se muestran las distintas pruebas de Biogen Center y neoBona:

<b>BIOGEN CENTER</b>	
<b>Prueba 1:</b>  Detección de aneuploidías 13, 18, 21, X, Y en sangre materna.	<b>Prueba 2:</b>  Detección de aneuploidías 13, 18, 21, X, Y, 9, 16, 22 y 8 Síndromes asociados a microdeleciones, en sangre materna.
<b>Ambas incluyen:</b>  consulta de consejo genético, detección de aneuploidías, sexo fetal en sangre materna y amniocentesis de confirmación en el caso de que se detecte alguna alteración	

**Tabla 1.** Biogen: Diagnóstico Prenatal. Datos de tabla tomados de Biogencenter (2020) (33).



NEOBONA SYNLAB			
neoBona (opción disponible para embarazo gemelar)	neoBona Advanced	Prenatal Test Extended Panel	Prenatal Test Extended Panel + Todos los cromosomas
Trisomías 21, 18 y 13  Sexo fetal (opcional)	Trisomías 21, 18 y 13  Aneuploidías X, Y  Sexo fetal	Trisomías 21, 18 y 13  Aneuploidías X, Y  Sexo fetal  Panel de microdeleciones	Trisomías 21, 18 y 13  Aneuploidías X, Y  Sexo fetal  Panel de microdeleciones  Aneuploidías en todos los cromosomas
Tecnología de secuenciación NGS paired-end. Fracción Fetal		Tecnología de secuenciación NGS convencional. Fracción Fetal	

**Tabla 2.** NeoBona: La nueva generación de Test Prenatal No Invasivo. Datos de tabla tomados de neoBona (2020) (34).

En resumen, en el mercado hay dos tipos de test: el básico y el avanzado o ampliado. En el test básico se detectan de forma sistemática alteraciones cromosómicas más frecuentes en la población: Síndrome de Down (trisomía 21), Síndrome de Edwards (trisomía 18), Síndrome de Patau (trisomía 13) y aneuploidías en los cromosomas sexuales: síndrome de Turner (monosomías XO), síndrome de Klinefelter (trisomía XXY), etc. (35). Por otro lado, en el test prenatal no invasivo avanzado o ampliado, además de las aneuploidías anteriormente citadas también se detectan alteraciones estructurales como: Síndrome Di George, Síndrome Deleción 1p36, Síndrome de Angelman, Síndrome de Prader-Willi, Síndrome de Maullido de gato y Síndrome de Wolf-Hirschhorn (35). Generalmente, los precios de estos test suelen ir desde los 500-600 euros en el caso de los test más sencillos, hasta los 700-800 euros para los test más ampliados. En prácticamente todos los laboratorios ofrecen una amniocentesis si el resultado del diagnóstico prenatal no invasivo obtuviese un resultado positivo (35).

#### 4.8. Otras aplicaciones

##### 4.8.1. Determinación del sexo e implicaciones en el asesoramiento sobre enfermedades ligadas al cromosoma X

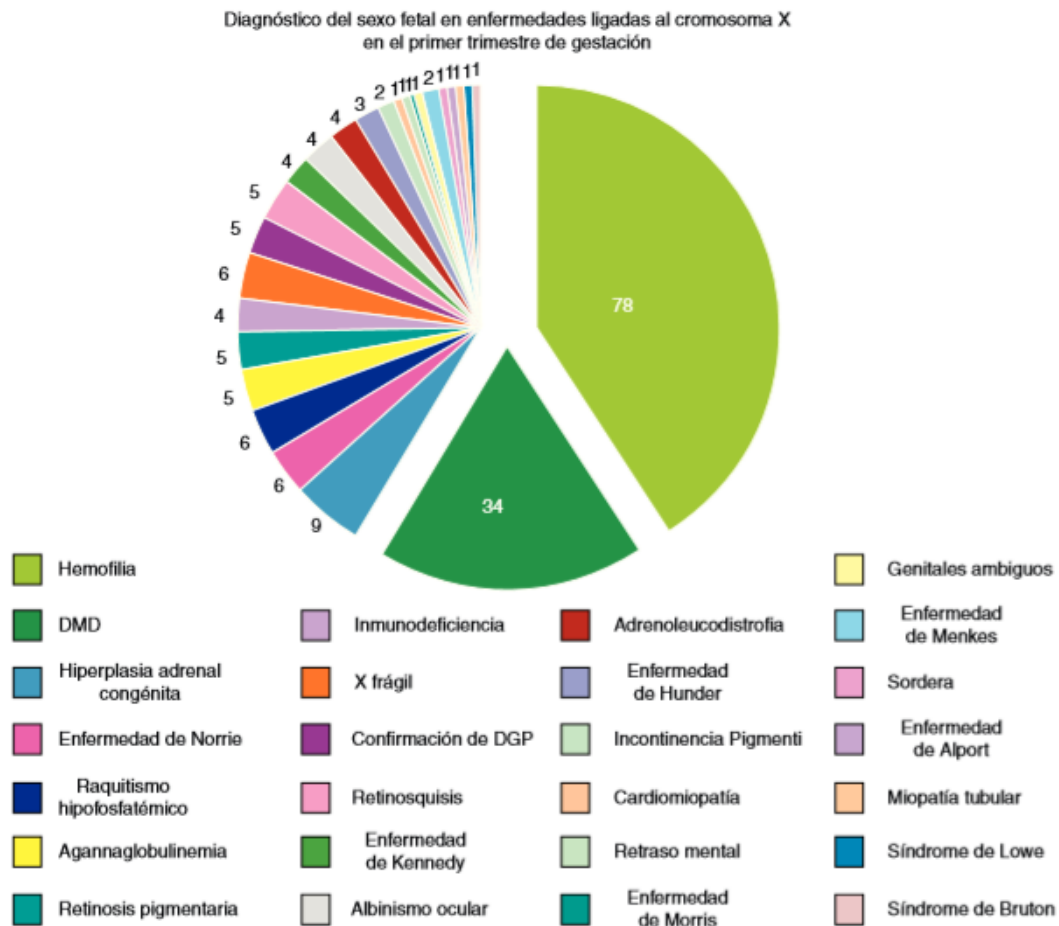
Esta técnica está basada en la amplificación de secuencias del cromosoma Y, en concreto los genes SRY y DYS14, de manera que la presencia de la secuencia se asocia a un feto varón, y su ausencia a un feto del sexo femenino (3).

No existen guías de buena praxis sobre cuando realizar la determinación, por lo que cada servicio ha establecido su propio protocolo. Suelen hacerse dos determinaciones entre la semana 7 y la semana 12 (siempre y cuando se pueda en el primer trimestre de gestación). Se ha demostrado en un estudio de validación que en muestras recogidas por debajo de la semana 7 de gestación la fiabilidad de la técnica era de un 80% debido a la presencia de falsos positivos, siendo eficaz hasta en un 99% entre las semanas 7 y 12. Además se realiza en este periodo por la posibilidad de realizar una biopsia corial en caso de ser un feto varón, y existir riesgo de alguna enfermedad ligada al cromosoma X de carácter recesivo que pueda ser diagnosticada con esta técnica (3).

Si que existe consenso, sin embargo, en cuanto a la técnica empleada, que es la PCR a tiempo real. La prueba además incluye amplificación en paralelo de un control que justifique la presencia de ADN materno en la muestra recogida (3).

Las enfermedades ligadas al cromosoma X son susceptibles de ser clara indicación para el test de determinación fetal. Con esta técnica son evitadas aproximadamente el 50% de las biopsias coriales para el diagnóstico de estas enfermedades. A continuación, se muestra una figura con algunos ejemplos de enfermedades ligadas al cromosoma X indicadas para este tipo de estudio (figura 23).



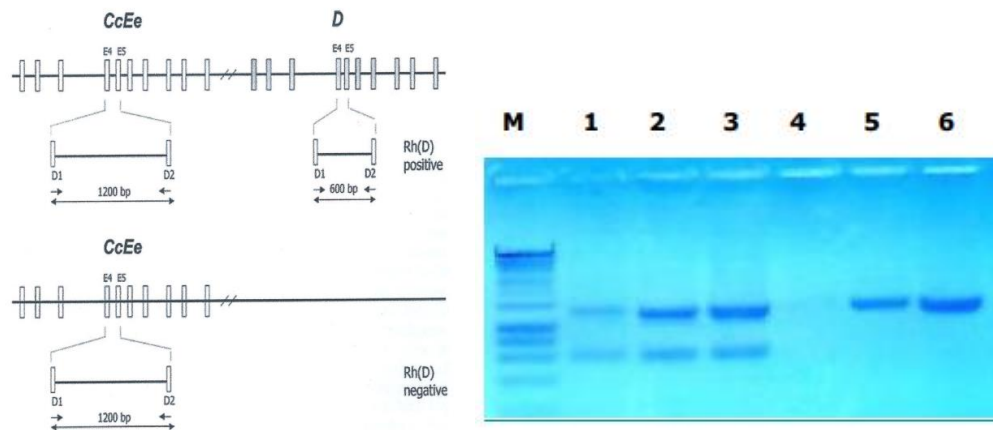


**Figura 23.** Representación de los diagnósticos de enfermedades por sexo fetal en sangre materna. Figura tomada de Rodríguez de Alba y cols. (2012) (3).

#### 4.8.2. Determinación del Rh+ en embarazos de riesgo (mujeres Rh -)

Esta prueba es utilizada en los embarazos de gestantes Rh (-) y es utilizada para la supresión del tratamiento de inmunoprofilaxis cuando se diagnostica al feto como Rh (-), ya que en este caso no existe riesgo de desarrollar enfermedad hemolítica del recién nacido (3).

La técnica empleada es también la PCR en tiempo real y los protocolos indican la amplificación de los exones 5, 7 y a veces el 10 del gen Rh D. Las variantes Rh en estos exones existen en la población caucásica y ofrecen la posibilidad de su detección prenatalmente. Esta determinación debe ser muy sensible ya que los falsos negativos tienen una gran repercusión clínica por el riesgo de desarrollar la enfermedad hemolítica del recién nacido, mientras que los falsos positivos no suponen riesgo ya que la gestante recibiría inmunoprofilaxis de forma innecesaria sin que esto suponga un riesgo para la gestante ni para el feto (3).



**Figura 24.** Determinación factor Rh por PCR. Figura tomada de BioTed. (2016) (36).

En la figura 24 se muestra un ejemplo de un análisis de PCR en diferentes individuos para la determinación del Rh. El locus Rh consiste en 2 genes estructurales: D y CcEe, los cuales codifican para la cadena del polipéptido D y las proteínas C/c y E/e respectivamente. La base de esta práctica es la amplificación de un fragmento del gen D. La amplificación de este fragmento indicará que la persona es Rh+. Los individuos Rh+ producirán 2 fragmentos de diferentes tamaños (1200pb y 600 pb) como vemos en el gel de agarosa (pocillos 1,2 y 3) y los individuos Rh- una única banda correspondiente al fragmento del gen CcEe (1200 pb) (pocillos 5 y 6). El pocillo indicado con una M es el marcador control que nos indica que la técnica ha sido correctamente realizada (36).

#### 4.8.3. Micro -deleciones y -duplicaciones

La detección de pequeñas inserciones y deleciones a partir de la NGS es más compleja de lo que se pensaba inicialmente. Las variantes de deleción o duplicación de una única base se alinean mal con el genoma de referencia, produciendo una elevada tasa de falsos positivos (37), de forma que este tipo de alteraciones no se detectan con la secuenciación masiva en el diagnóstico prenatal. En contraposición, la mayoría de los laboratorios ofrecen estas pruebas para deleciones y duplicaciones de pequeños fragmentos (38,39) . En un estudio (28) se analizaron 8 síndromes de microdeleción: 1p36, Cri-du-chat, DiGeorge, Wolf-Hirschhorn, Prader Willi, Angelman, Miller-Dieker y Phelan-McDermid, en el que la tasa de detección fue de 92,3%-97,2%. Por lo tanto, actualmente son muchos los laboratorios que ya ofrecen para el diagnóstico prenatal no invasivo la detección de varios síndromes de microdeleción (22q11, 5p-, 1p36, 15q11) (28). Antiguamente estos síndromes sólo se podían diagnosticar mediante la obtención de células fetales por amniocentesis y realización de un cariotipo y un FISH. (40).

#### 4.8.4. Enfermedades monogénicas heredadas por vía paterna

Hasta hace muy poco este estudio se ha visto limitado a enfermedades de herencia paterna debido a la presencia mayoritaria de ADN materno en la muestra de plasma. De esta forma, es más fácil aislar el ADN de origen paterno minoritario que difiere del

ADN materno en nuestra muestra. Aun así, éste es un diagnóstico que no debe ser subestimado debido a la posibilidad de detectar ciertas enfermedades de transmisión genética de relativa importancia (3). A continuación, se muestran algunos ejemplos:

#### 4.8.4.1. Enfermedades de herencia dominante

En las familias en las cuales el padre es portador de una mutación de herencia dominante, simplemente la ausencia de esta mutación en sangre materna puede ser diagnóstica. En caso de estar presente podríamos decir que el niño está afecto de dicha enfermedad. Por el contrario, la ausencia permite diagnosticar un niño sano (3).

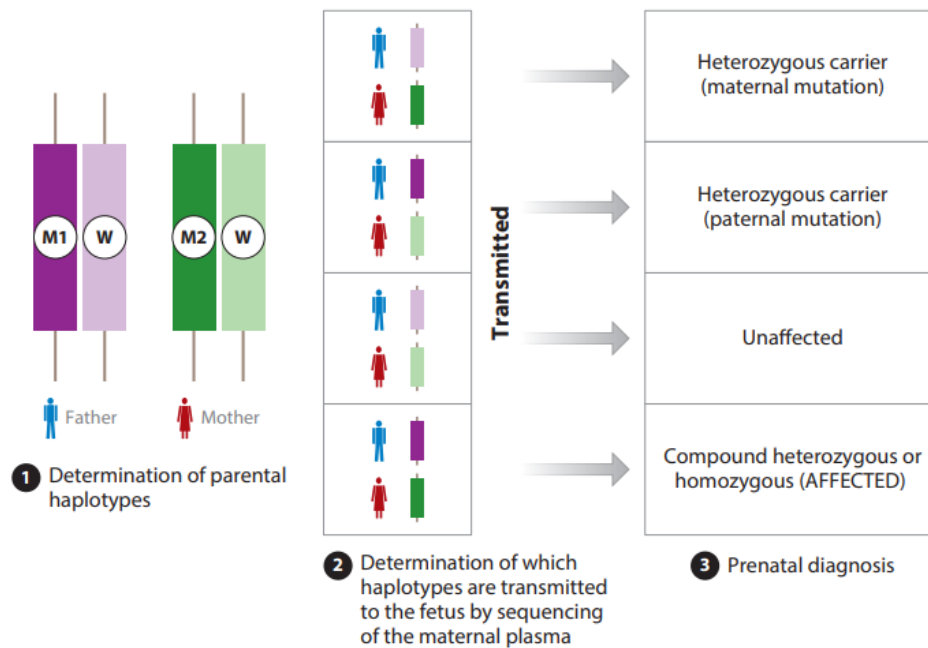
Algunos ejemplos de enfermedades de herencia dominante que son estudiadas en plasma materno son: enfermedad de Huntington, distrofia miotónica y distonía de desarrollo precoz (3).

#### 4.8.4.2. Enfermedades de herencia recesiva

En caso de enfermedades de carácter recesivo se ha de cumplir una importante condición: la mutación que portan ambos progenitores ha de ser distinta para que sea posible identificar la mutación de cada progenitor (figura 25) (3).

Al igual que en los casos de herencia dominante, el diagnóstico de la enfermedad en cuestión se realiza por el criterio presencia/ausencia del defecto paterno. Sin embargo, una importante diferencia respecto a las enfermedades de herencia dominante es que en las enfermedades de herencia recesiva no podremos tener un diagnóstico completo por no poder conocer el carácter que tendrá el niño de portador o sano respecto a la mutación materna. Ahora bien, el poder detectar la mutación paterna o no en sangre materna nos será de gran utilidad de cara a evitar el tener que proceder con un diagnóstico precoz invasivo, es decir, en caso de no presentar la mutación paterna en sangre materna, podremos evitar realizar técnicas invasivas ya que al ser una enfermedad de herencia recesiva el feto será o sano o portador no enfermo (3).

Ejemplos de estas enfermedades que pueden ser estudiadas en plasma materno por sus características serían: amaurosis congénita de Leber y acidemia propiónica (3). Otras enfermedades de herencia recesiva estudiadas por esta técnica son: hiperplasia adrenal congénita (sólo un grupo ha publicado el estudio de la mutación paterna, por lo que lo importante en esta enfermedad es la determinación del sexo fetal y la determinación de andrógenos) y fibrosis quística, enfermedad en la que se han descrito tres estrategias distintas de diagnóstico prenatal como son el análisis de fragmentos de restricción, PCR alelo específica y secuenciación de una única base (minisequenciación) (3).



**Figura 25.** Test de diagnóstico prenatal en enfermedades autosómico-recesivas. Se representan los haplotipos parentales (cajas en color) ligados al alelo silvestre (W) o mutante (M1, mutación paterna; M2, mutación materna). Figura tomada de Wong y cols. (2016) (26).

#### 4.9. Problemas éticos asociados

Las innovaciones tecnológicas que se han producido en los últimos años en el campo del diagnóstico prenatal vienen acompañadas de diferentes conflictos éticos, sociales y jurídicos que en ocasiones son de difícil resolución. Uno de los principales dilemas éticos es el diagnóstico prenatal y la relación que tiene con el aborto selectivo, por lo que la Organización Mundial de la Salud (OMS) estableció una serie de normativas internacionales con el fin de proteger a familias con enfermedades genéticas o defectos genéticos y desarrollar políticas que respeten la ética y justicia para todos (41).

El desarrollo del diagnóstico prenatal ha provocado la apertura de diferentes temas y uno de ellos es la legalización o despenalización el aborto cuando el feto presenta alguna malformación congénita cuya severidad pueda comprometer su vida. La OMS establece que debe ofrecerse a todas las parejas con alto riesgo de enfermedad genética o defectos congénitos, para darles la oportunidad de tomar la decisión que consideren más adecuada, independientemente de sus pensamientos acerca del aborto selectivo (41).

En la mayoría de los casos el diagnóstico prenatal proporcionará tranquilidad a los padres, pero en el 2-3% de las ocasiones (41) se debe de informar a los padres de que existe un defecto genético/congénito y éstos tendrán la posibilidad de decidir entre finalizar el embarazo (si la gravedad compromete la vida) o el afrontar el tener un hijo enfermo. Para que una nación pueda ofertar un diagnóstico prenatal, tiene que tener los medios necesarios para afrontar cualquiera de las dos situaciones anteriormente comentadas (41).

Otro de los grandes problemas asociados al diagnóstico prenatal en sangre materna es la posibilidad de la determinación del sexo fetal a una edad gestacional muy temprana. La gran precisión, seguridad, disponibilidad y facilidad de uso que esta técnica ofrece para la determinación del sexo frente a la incertidumbre que otros métodos como el ultrasonido todavía tienen, puede dar lugar a decisiones con información más certera eliminando el riesgo de resultados inexactos que podrían moderar las decisiones tomadas en torno a la interrupción del embarazo en base al sexo del feto (42).

La interrupción del embarazo por estas razones en el primer trimestre es más fácil ya que permite a la madre evitar el vínculo materno-fetal, y por lo tanto será necesario explorar estos problemas éticos en las parejas antes de optar por un diagnóstico prenatal temprano del sexo (42).

Otro de los problemas relacionados con la determinación del sexo con estas pruebas de screening es que la selección generalizada del sexo podría provocar daños a nivel social. Este daño ya puede verse en países con alta proporción de un mismo sexo debido a determinaciones culturales del mismo (42).

La selección del sexo es un problema ético que viene siendo discutido desde hace mucho tiempo. Las cuestiones más relevantes relacionadas con este problema son algunas como la mercantilización de los niños, ya que se considera que la elección del sexo es una forma de “diseñar” a los niños, de forma que los comercializa en vez de verlos como individuos. Otra de las cuestiones es el sexismo. Se considera que la elección del sexo es un comportamiento sexista debido a que hace un juicio de valor basado únicamente en el atributo del sexo, siendo los puntos nocivos desde este punto de vista la supremacía sexual de un determinado sexo y los estereotipos sexuales ligados al género del bebé (42).

Existen múltiples críticas feministas acerca de la determinación sexual prenatal que señalan que proporcionar una determinación del sexo a través de estas técnicas de diagnóstico prenatal fomenta la combinación entre sexo y género, y que los beneficios sociales que se obtienen al socavar las creencias esencialistas de género superan el derecho de los padres de conocer el sexo del feto. Además, el conocer el sexo del feto altera los patrones de consumo de los padres, los cuales contribuyen a la creación de un entorno de género a través de objetos como los juguetes o la ropa del bebé incluso antes de que nazca. Este consumo prenatal de género reforzaría innecesariamente las normas y estereotipos de género (42).

Todavía no está claro qué impacto real tiene el diagnóstico prenatal en sangre materna sobre la interrupción del embarazo asociado al sexo. Se requiere una evidencia rigurosa para determinar si está ocurriendo realmente y cuál es la frecuencia con la que se producen este tipo de casos. Se desconoce también si el diagnóstico prenatal no invasivo asocia mayor cantidad de interrupciones del embarazo asociado al sexo, en comparación a otras técnicas de determinación del sexo, como el ultrasonido (42).

Por último es importante recalcar que lo más importante es siempre respetar los cuatro principios fundamentales considerados el paradigma de la bioética : la beneficencia, la

no maleficencia, la autonomía y la justicia (41). La conducta de la persona que está ejerciendo de asesor genético es la de basarse en estos principios.

#### 4.10. Ventajas y limitaciones de esta técnica

Las ventajas con las que cuenta el diagnóstico prenatal no invasivo son múltiples en comparación con otras pruebas prenatales, como el triple screening o la amniocentesis.

- Nos permite un diagnóstico precoz, ya que a partir de la semana 10 de embarazo ya puede realizarse la prueba con total fiabilidad (35).
- Solamente es necesaria una muestra de sangre de la madre, por lo que es una prueba que cuenta con una gran comodidad y sencillez para su realización(35). Además de que, por su realización, no conlleva ningún riesgo para el feto ni para la madre (35).
- Los resultados se pueden obtener entre 3 y 15 días, dependiendo de la complejidad de la prueba realizada y las enfermedades que queramos detectar en una muestra (35).
- Cuenta con una alta precisión ya que su tasa de detección es superior al 99%, por lo que disminuyen drásticamente los falsos positivos llegando hasta el 0,1% (35). Casi el 90% de las mujeres gestantes en las que se indica que el bebé podría tener una anomalía obtendrían con esta técnica un resultado más cercano a la realidad de la situación de su bebé (24). Gracias a esto conseguimos disminuir significativamente el número de amniocentesis realizadas.

Debido a que se trata de una prueba relativamente reciente, aun cuenta con algunas limitaciones que debemos tener en cuenta, por lo que no puede sustituir de forma definitiva a las pruebas invasivas:

- Debemos tener en cuenta que la baja cantidad de ADNfe en sangre materna es un problema de cara a su detección. Se requieren técnicas altamente específicas y eficientes para su detección y purificación (2). Esto es lo que conlleva que el test prenatal no invasivo sea tan caro. No en todos los casos está cubierto por la seguridad social, y en esos casos las madres que quieren acceder a esta prueba deben de hacerse cargo de todos los gastos (35).
- Aun hoy en día, este test tiene su capacidad diagnóstica limitada. No detecta cualquier anomalía genética, sino sólo aquellas para las que se ha diseñado la prueba, que son a su vez las más frecuentes (35). Es importante resaltar que en el caso de cromosomopatías, sólo permite detectar pérdida o ganancia de material genético, pero no permite detectar otro tipo de anomalías estructurales importantes como pueden ser las translocaciones o inversiones (35).

- La prueba no es capaz de detectar las malformaciones fetales anatómicas, y por tanto en ningún caso podría sustituir a la ecografía prenatal (35).
- Aunque tenga elevada precisión, sigue siendo una prueba de cribado, por lo que siempre debe ser confirmada posteriormente por pruebas invasivas (35).
- Por último, hay que comentar que en algunos casos el diagnóstico se ve afectado por diferentes variables, como puede ser la obesidad, embarazos gemelares (en este caso la prueba no es válida para analizar los cromosomas sexuales) (35), o si la embarazada ha recibido recientemente una transfusión de sangre, trasplante, terapia celular o inmunoterapia, donde no será posible una evaluación precisa del ADNfe (43).

En la siguiente figura se muestra un resumen de las diferentes pruebas de diagnóstico molecular y sus capacidades diagnósticas frente a diferentes alteraciones genéticas que pueden dar lugar a distintas enfermedades:

**Tabla II.** Pruebas de diagnóstico molecular de uso habitual. Detección, resolución, tiempo de respuesta y coste actual estimado para cada prueba (Modificado de Katsanis & Katsanis, 2013).  
Abreviaturas: FISH: *Fluorescent in situ hybridization*; MLPA: *Multiple Ligation-dependent Probe Amplification*; UPD: *Disomía uniparental*

Prueba genética	Mutaciones puntuales	Ganancias o pérdidas	Disomía uniparental	Reordenamientos balanceados	Expansión de repeticiones	Epimutación	Resolución	Tiempo de respuesta	Coste estimado
Cariotipo	–	X	–	X	–	–	5-10 Mb	1 mes	150€
FISH	–	X	–	X	–	–	Tamaño de sonda	< 1 semana	250-500€
aCGH	–	X	–	–	–	–	50 – 100 Kb	1 semana	400-1.000€
SNP array	+/-	X	X	–	–	–	–	1 semana	300-800€
Secuenciación por Sanger	X	–	–	–	+/-	+/-	–	Semanas - meses	Variable
PCR y electroforesis	–	–	X	–	X	–	–	< 1 semana	150€
MLPA	+/-	X	–	–	–	MS-MLPA	10-50 zonas específicas	< 1 semana	100-200€
Captura selectiva	X	–	–	–	–	–	Genes concretos	1 semana – 1 mes	500-800€
Secuenciación de exomas	X	X	X	–	–	–	Zonas codificantes	1 semana – 1 mes	1.200-1.500€
Secuenciación de genomas	X	X	–	+/-	–	MS-Sec	pb	>1 mes	>2.500€

**Figura 26.** Nuevas metodologías en el estudio de enfermedades genéticas y sus indicaciones. Figura tomada de Palacios-Verdú y cols. (2014) (28).

En la línea del diagnóstico prenatal, podemos destacar en esta tabla que la secuenciación tiene limitaciones en cuanto al diagnóstico de reordenamientos balanceados y la expansión de repeticiones. El diagnóstico de los reordenamientos balanceados podríamos suplirlo con otras técnicas como la realización de un FISH o un cariotipo, y la expansión de repeticiones con una PCR y electroforesis (44). Por lo tanto, la elección de la técnica molecular depende de la sospecha de determinadas enfermedades, ya que en determinados casos no nos sería útil la prueba de diagnóstico prenatal en sangre materna y debemos requerir el uso de pruebas invasivas y realización de técnicas diferentes a la NGS.

Ejemplos de enfermedades que pueden ser diagnosticadas mediante la realización de un cariotipo y técnica FISH son el Síndrome del cromosoma 8 recombinante que consiste en un trastorno cromosómico complejo debido a una inversión pericéntrica parental del cromosoma 8 con puntos de ruptura constantes (p23.1q22.1) (45). Otro ejemplo de este tipo de enfermedades diagnosticadas por técnicas diferentes a la NGS es el Síndrome de Emmanuel que resulta de una traslocación (11;22) en la forma balanceada (44).



## **5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS**

Las perspectivas futuras del diagnóstico prenatal no invasivo son, sobre todo, la incorporación de estos test a la mayoría de los servicios públicos de salud para así poder hacer accesible esta prueba a todas las mujeres gestantes

El primer hospital público en recibir la certificación para poder realizar el test genético prenatal fue el hospital Ramón y Cajal de Madrid. La comunidad de Cantabria implantó en 2016 el test de diagnóstico prenatal no invasivo dentro del programa de cribado prenatal, siendo una de las primeras Comunidades Autónomas en hacerlo. Otras Comunidades Autónomas como Galicia, Aragón y Cataluña también lo han implantado dentro del programa de cribado prenatal y Andalucía está desarrollando un estudio piloto (25).

En abril del 2019 el Ministerio de Sanidad concluye que el test de diagnóstico prenatal no invasivo tiene un menor coste para el Sistema Nacional de Salud, además de reducir el número de pérdidas fetales, que combinado con las técnicas ya realizadas del triple screening constituye un buen método de sospecha de las trisomías 21, 18 y 13 (25). La realización de esta prueba en la Sanidad Pública queda limitada como prueba de cribado prenatal de segunda línea en los embarazos únicos en los que previamente se haya establecido un riesgo alto de trisomía fetal para los cromosomas anteriormente citados, teniendo presente que nunca supone una alternativa a la realización de una amniocentesis en caso de detectarse un riesgo (25).

A pesar de los avances tecnológicos en enfermedades monogénicas, la aceptación clínica generalizada de las pruebas para estas enfermedades se ve obstaculizada por la baja frecuencia de la enfermedad genética individual y la necesidad creciente del desarrollo de ensayos personalizados individuales, debido a las diferencias genéticas de cada individuo en particular (26).

Desde el punto de vista técnico, la NGS del genoma fetal puede ser en el futuro una prueba ofertada universalmente para la detección de enfermedades genéticas en el feto. Sin embargo, aún requiere una discusión ética y socioeconómica de los riesgos de ofrecer este test a todas las mujeres gestantes (26).

## 6. **BIBLIOGRAFIA**

1. Mar Sánchez Movellán, Clara Esparza del Valle, Juan José Montero Fanjul, Begoña Loidi Fernandez-Troconiz, PROTOCOLO DNA FETAL EN SANGRE MATERNA 2019.pdf. Servicio Cantabro de Salud;
2. Breveglieri G, D'Aversa E, Finotti A, Borgatti M. Non-invasive Prenatal Testing Using Fetal DNA. Mol Diagn Ther. abril de 2019;23(2):291-9.
3. Rodríguez de Alba M, Bustamante-Aragonés A, Perlado S, Trujillo-Tiebas MJ, Díaz-Recasens J, Plaza-Arranz J, et al. Diagnóstico prenatal no invasivo: presente y futuro de mano de las nuevas tecnologías. Diagnóstico Prenatal. abril de 2012;23(2):67-75.
4. Movellán MS. Autoría: Comisión de Seguimiento del Programa. :13.
5. Servicio Cantabro de Salud. Consejería de Sanidad del Gobierno de Cantabria. Prog. anom. cromosomicas 2019.pdf. 2019.
6. Gelambi M. Poliploidía: tipos, en animales, en humanos, en plantas [Internet]. Lifeder. 2019 [citado 2 de junio de 2020]. Disponible en: <https://www.lifeder.com/poliploidia/>
7. Robert L. Nussbaum MD FACP FACMG (Redactor), Roderick R. McInnes CM MD PhD FRS(C) FCAHS FCCMG (Redactor), Huntington F Willard PhD (Redactor). Thompson & Thompson. Genética En Medicina Y Student Consult. 8ª Edición.
8. Cómo Ocurren las Anomalías Cromosómicas: la Meiosis, la Mitosis, la Edad Materna y el Entorno [Internet]. [citado 7 de abril de 2020]. Disponible en: <https://carefirst.staywellsolutionsonline.com/spanish/DiseasesConditions/Pediatric/MedicalGenetics/90,P05233>
9. Nina N. Powell-Hamilton. Síndrome de Down (trisomía 21) - Pediatría [Internet]. Manual MSD versión para profesionales. [citado 11 de mayo de 2020]. Disponible en: <https://www.msdmanuals.com/es-es/professional/pediatric/anomal%C3%ADas-cromos%C3%B3micas-y-g%C3%A9nicas/s%C3%ADndrome-de-down-trisom%C3%ADa-21>
10. ECOGRAFÍA DE LAS 11-13+6 SEMANAS [Internet]. Fundación iMaterna. [citado 11 de mayo de 2020]. Disponible en: <https://imaterna.org/ecografia-de-las-11-13-6-semanas/>
11. Nina N. Powell-Hamilton. Trisomía 18 - Pediatría [Internet]. Manual MSD versión para profesionales. [citado 11 de mayo de 2020]. Disponible en: <https://www.msdmanuals.com/es-es/professional/pediatric/anomal%C3%ADas-cromos%C3%B3micas-y-g%C3%A9nicas/trisom%C3%ADa-18>
12. Infogen | Síndrome de Edwards Trisomía 18 [Internet]. Infogen. [citado 11 de mayo de 2020]. Disponible en: <https://infogen.org.mx/>

13. Nina N. Powell-Hamilton. Trisomía 13 - Pediatría [Internet]. Manual MSD versión para profesionales. [citado 11 de mayo de 2020]. Disponible en: <https://www.msdmanuals.com/es/professional/pediatr%C3%ADa/anomal%C3%AAs-cromos%C3%B3micas-y-g%C3%A9nicas/trisom%C3%ADa-13>
14. S. de Rett y cols. Cariotipo en el Síndrome de Turner [Internet]. Síndrome de Turner: Información completa y actualizada. 2018 [citado 11 de mayo de 2020]. Disponible en: <https://sindrome-de-turner.com/genetica/cariotipo-monosomia-x/>
15. Imaroca. Aneuploidias y Poliploidias: Síndrome Triple-x [Internet]. Aneuploidias y Poliploidias. 2009 [citado 11 de mayo de 2020]. Disponible en: <http://biogenetica-imaroca.blogspot.com/2009/12/sindrome-triple-x.html>
16. Robles PP. Síndrome de Klinefelter - Logopedia - logopedaencasa.es [Internet]. logopedaencasa. 2013 [citado 11 de mayo de 2020]. Disponible en: <http://www.logopedaencasa.es/comunicaciones/sindrome-de-klinefelter/>
17. Síndrome de Jacobs :: A Biologia e os desafios da atualidade [Internet]. [citado 11 de mayo de 2020]. Disponible en: <https://os-misterios-da-vida8.webnode.pt/sindrome-de-jacobs/>
18. Apuntes de la asignatura «Laboratorio en el Diagnóstico Clínico» de 5º curso. Facultad de Medicina de la universidad de Cantabria. En universidad de Cantabria; 2019.
19. Martínez-Fernández ML, Bermejo E, Martínez-Frías ML. Ejemplos clínicos de alteraciones crípticas del ADN, y guías para sospechar que un niño pueda tener alguna alteración críptica o molecular. SEMERGEN - Medicina de Familia. diciembre de 2010;36(10):573-8.
20. Instituto Nacional de Estadística (INE). Encuesta de Fecundidad. Notas de prensa. 9 de abril de 2019;
21. Instituto Cantabro de Estadística (ICANE). MUJERES Y HOMBRES desde la perspectiva de género. Cantabria 2017. :217.
22. Dang T-T, Phung TM, Le H, Nguyen BV, Nguyen TS, Nguyen TLH, et al. Preimplantation genetic testing of aneuploidy by Next Generation Sequencing: association of maternal age and chromosomal abnormalities of blastocyst. Open Access Maced J Med Sci [Internet]. 20 de diciembre de 2019 [citado 7 de abril de 2020];7(24). Disponible en: <https://www.idpress.eu/mjms/article/view/4003>
23. Gómez Manrique A, Abarca Martínez LJ, Ávila Padilla S, Villalón Villarroel MC, García Sagredo JM, Repollés Escarda M. Cribado combinado para la detección de trisomía 21 en el primer trimestre de la gestación. Impacto sobre la tasa de procedimientos invasivos de diagnóstico prenatal tras 5 años de implementación. Progresos de Obstetricia y Ginecología. abril de 2012;55(4):173-80.

24. Bianchi DW, Chiu RWK. Sequencing of Circulating Cell-free DNA during Pregnancy. *N Engl J Med*. 2 de agosto de 2018;379(5):464-73.
25. Sergio Rogel Cayetano, Salvador Z. La amniocentesis: ¿cuáles son sus indicaciones y posibles riesgos? [Internet]. Reproducción Asistida ORG. 2020 [citado 14 de mayo de 2020]. Disponible en: <https://www.reproduccionasistida.org/amniocentesis/>
26. Wong FCK, Lo YMD. Prenatal Diagnosis Innovation: Genome Sequencing of Maternal Plasma. *Annu Rev Med*. 14 de enero de 2016;67(1):419-32.
27. Garrigues F. NGS: Secuenciación de Segunda Generación [Internet]. Genotipia. 2017 [citado 28 de abril de 2020]. Disponible en: <https://genotipia.com/ngs-secuenciacion/>
28. M.G. Palacios-Verdú, L.A. Pérez-Jurado. Nuevas metodologías en el estudio de enfermedades genéticas y sus indicaciones [Internet]. [citado 14 de mayo de 2020]. Disponible en: <https://www.pediatruiintegral.es/publicacion-2014-10/nuevas-metodologias-en-el-estudio-de-enfermedades-geneticas-y-sus-indicaciones/>
29. tony,abm. An Intro to NGS [Internet]. [citado 14 de mayo de 2020]. Disponible en: [/marketing/knowledge\\_base/next\\_generation\\_sequencing\\_introduction](/marketing/knowledge_base/next_generation_sequencing_introduction)
30. Bunnik E, Le Roch K. An Introduction to Functional Genomics and Systems Biology. *Advances in wound care*. 1 de noviembre de 2013;2:490-8.
31. NGS Workflow Steps | Illumina sequencing workflow [Internet]. [citado 14 de mayo de 2020]. Disponible en: <https://emea.illumina.com/science/technology/next-generation-sequencing/beginners/ngs-workflow.html>
32. Conventional NGS DNA Library Preparation Kits for Illumina® Clinisciences [Internet]. [citado 14 de mayo de 2020]. Disponible en: <https://www.clinisciences.com/es/comprar/cat-conventional-ngs-dna-library-preparation-3454.html>
33. Biogen | Diagnóstico Prenatal No invasivo [Internet]. [citado 14 de mayo de 2020]. Disponible en: <https://biogencenter.com/diagnostico-prenatal-no-invasivo/>
34. La nueva generación de Test Prenatal No Invasivo | neoBona [Internet]. [citado 14 de mayo de 2020]. Disponible en: <http://www.neobona.es/>
35. Test prenatal no invasivo en sangre materna: ventajas e indicaciones [Internet]. Reproducción Asistida ORG. 2019 [citado 15 de mayo de 2020]. Disponible en: <https://www.reproduccionasistida.org/test-de-adn-fetal-en-sangre-materna/>
36. DETERMINACION-FACTOR-Rh-PCR.pdf [Internet]. [citado 12 de mayo de 2020]. Disponible en: <https://www.bioted.es/protocolos/DETERMINACION-FACTOR-Rh-PCR.pdf>

37. Rodríguez-Santiago B, Armengol L. Tecnologías de secuenciación de nueva generación en diagnóstico genético pre- y postnatal. *Diagnóstico Prenatal*. abril de 2012;23(2):56-66.
38. contenidos TTT Diseño, Comunicación y. Técnicas no invasivas de diagnóstico prenatal: Test del ADN fetal en sangre materna [Internet]. IB BIOTECH. [citado 13 de mayo de 2020]. Disponible en: </es/info/tecnicas-no-invasivas-de-diagnostico-prenatal-test-del-adn-fetal-en-sangre-materna/>
39. Test Genético Prenatal no Invasivo [Internet]. Sanitas. [citado 13 de mayo de 2020]. Disponible en: [//www.sanitas.es/sanitas/seguros/es/particulares/servicios\\_salud/maternidad/diagnostico-prenatal-no-invasivo/index.html](//www.sanitas.es/sanitas/seguros/es/particulares/servicios_salud/maternidad/diagnostico-prenatal-no-invasivo/index.html)
40. Laczmanska I, Stembalska A, Gil J, Czemarmazowicz H, Sasiadek M. Cri du chat syndrome determined by the 5p15.3→pter deletion—diagnostic problems. *European Journal of Medical Genetics*. enero de 2006;49(1):87-92.
41. Noel Taboada Lugo. Ethical considerations in prenatal diagnosis and genetic counseling [Internet]. Universidad de Ciencias Médicas de Villa Clara; 2017. 15 p. (Humanidades Médicas 2017; vols. 17(1): 2-16). Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/hmc/v17n1/hmc02117.pdf>
42. Bowman-Smart H, Savulescu J, Gyngell C, Mand C, Delatycki MB. Sex selection and non-invasive prenatal testing: A review of current practices, evidence, and ethical issues. *Prenatal Diagnosis*. marzo de 2020;40(4):398-407.
43. CGC GENETICS. Hoja de solicitud. Test Prenatal No Invasivo. [Internet]. [citado 15 de mayo de 2020]. Disponible en: <https://www.cgcgenetics.com/download/es/tomorrow-es-espanha-mod-hs-tm-04-16.pdf>
44. M.G. Palacios-Verdú, L.A. Pérez-Jurado. Nuevas metodologías en el estudio de enfermedades genéticas y sus indicaciones [Internet]. [citado 15 de mayo de 2020]. Disponible en: <https://www.pediatriaintegral.es/publicacion-2014-10/nuevas-metodologias-en-el-estudio-de-enfermedades-geneticas-y-sus-indicaciones/>
45. Orphanet: Síndrome del cromosoma 8 recombinante [Internet]. [citado 27 de mayo de 2020]. Disponible en: [https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC\\_Exp.php?Ing=ES&Expert=96167](https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?Ing=ES&Expert=96167)

## **7. AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar, me gustaría agradecerle este trabajo a mi tutora Elena por su implicación en el trabajo, por resolverme y orientarme en todas mis dudas y por hacer posible este trabajo.

Mi más sincera gratitud a mis padres y a mis hermanos, por su incansable apoyo, por hacer de mi hoy lo que soy y ayudarme a llegar hasta aquí, ya que sin ellos no hubiera sido posible. Por nunca poner límites a mis sueños y ayudarme a llegar a ellos. Por su ejemplo de constancia, lucha y superación. Estoy orgullosa de todo lo que hemos construido.

A Jesús, por su creer en mi incluso cuando yo misma había dejado de hacerlo. Por toda la alegría que a puesto en mi y en este proyecto. Gracias por ser siempre ese apoyo incondicional, ya que sin él no hubiera sido posible.

A todos mis amigos, por ser ese hogar al que siempre volver. Por acompañarme en este camino y estar siempre a mi lado. En especial a Alba y a Gemma, por darme tantos consejos y ayudarme con sus ánimos en este y en otros tantos proyectos.

Al resto de mi familia por confiar siempre en mi y esperar mi vuelta siempre con los brazos abiertos. Estoy muy orgullosa de teneros siempre tan cerca, a pesar de la distancia.

Por último, agradecer a todos los docentes que han puesto su granito de arena en hacer de mi vocación por esta profesión cada día mas grande. Por toda su paciencia y sabiduría compartida. Gracias a todos vosotros espero en un futuro convertirme en una buena medica y una gran profesional.